



# **Produção de Hidromel: efeito das condições de fermentação**

**Teresa Maria da Cruz Gomes**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do  
Grau de Mestre em Biotecnologia*

*Orientado por*

**Prof<sup>ª</sup> Doutora Maria Letícia Miranda Fernandes Estevinho**

**Prof<sup>ª</sup> Doutora Elsa Cristina Dantas Ramalhosa**

**Bragança**

**2010**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia e Biotecnologia e de Agro-Indústrias do Departamento de Produção e Tecnologia Vegetal da Escola Superior Agrária de Bragança e contou com o apoio financeiro de uma bolsa de investigação concedida no âmbito do **Projecto PTDC/AGR-ALI/68284/2006** “Optimização das Condições de Produção de Hidromel”, financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia.

## **Agradecimentos**

A elaboração deste trabalho só foi possível graças à colaboração e ao contributo de várias pessoas, às quais gostaria de exprimir o meu agradecimento e profundo reconhecimento.

Em primeiro lugar, à Professora Doutora Letícia Estevinho, pelo acompanhamento e orientação, transmitindo-me os melhores conhecimentos, contribuindo para o meu crescimento intelectual. Agradecer a dedicação, a disponibilidade e a simpatia com que sempre me recebeu.

À Doutora Elsa Ramalhosa, pelo tempo que generosamente me dedicou, pelo apoio durante o processo de definição e orientação, pelos conhecimentos enriquecedores que me transmitiu, pela compreensão, ajuda e amizade.

À Doutora Teresa Dias, ao Engenheiro João Verdial Andrade e ao Doutor Vasco Cadavez, pela disponibilidade e pelos conhecimentos científicos transmitidos.

Ao Eng<sup>o</sup> Jorge Sá Morais, pela disponibilidade, ajuda, paciência e pela crítica construtiva.

Aos meus amigos, pelo incentivo, apoio e amizade, em especial à Carlinha que me ajudou a tornar a realização deste trabalho possível. Obrigado pelos bons momentos passados que ajudaram a superar as dificuldades do trabalho.

Às funcionárias e colegas do laboratório de Microbiologia e do laboratório de Agro-indústrias, em especial à Céu, pela disponibilidade, amizade e ajuda técnica prestada ao longo do trabalho experimental.

Ao Márcio, pela constante motivação, paciência e carinho que me dedicou ao longo deste trabalho.

Aos meus pais e irmãos, especialmente a ti mãe, pelo apoio incondicional, amor e incentivo nas horas mais difíceis.

# Índice

<b>RESUMO .....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>x</b>
<b>Capítulo I: Introdução .....</b>	<b>11</b>
1. INTRODUÇÃO GERAL AO TEMA E PRINCIPAIS OBJECTIVOS DO TRABALHO .....	12
2. INTRODUÇÃO .....	13
2.1. O MEL .....	13
2.1.1 Composição e propriedades físico-químicas .....	13
2.2 HIDROMEL .....	14
2.2.1 Problemas inerentes ao processo de produção de hidromel .....	15
2.3 OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO ASSOCIADAS À ELABORAÇÃO DE HIDROMEL .....	17
<b>Capítulo II: Material e Métodos .....</b>	<b>20</b>
3. DESCRIÇÃO GERAL DOS ESTUDOS REALIZADOS .....	21
Estudo I) Produção de hidromel às escalas laboratorial e piloto – ensaios preliminares .....	21
I.1. Microrganismo utilizado e preparação dos mostos .....	21
I.2 Fermentação do mosto à escala laboratorial .....	22
I.3 Fermentação do mosto à escala piloto .....	24
I.4 Quantificação de glucose, frutose, glicerol e ácido acético .....	24
Estudo II) Análise do processo de fermentação em relação aos factores, temperatura e concentração de nutrientes adicionados ao mosto, para duas estirpes comerciais de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> através de um desenho experimental .....	24
II.1 Microrganismos utilizados e preparação dos mostos .....	25
II.2 Fermentações .....	25
II.3 Desenho experimental .....	25
Estudo III) Produção de hidromel à escala piloto segundo as melhores condições determinadas no Estudo II) de forma a obter um “hidromel doce” e outro “seco” .....	28
III.1 Microrganismo .....	28
III.2 Preparação dos mostos .....	28
III.3 Fermentações à escala piloto .....	29
III.4 Provas organolépticas .....	31
III.5 Análise estatística .....	32

<b>Capítulo III: Resultados e Discussão .....</b>	<b>33</b>
Estudo I) Produção de hidromel às escalas laboratorial e piloto – ensaios preliminares .....	34
I.1    Produção de hidromel à escala laboratorial.....	34
I.2    Produção de hidromel à escala piloto.....	34
Estudo II) Análise do processo de fermentação em relação aos factores, temperatura e concentração de nutrientes adicionados ao mosto, para duas estirpes comerciais de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> através de um desenho experimental.....	37
II.1    Desenho experimental.....	37
II.1.1    Evolução das várias fermentações realizadas ao longo do tempo para as duas leveduras	38
II.1.2    Tratamento estatístico dos resultados .....	44
Estudo III) Produção de hidromel à escala piloto segundo as melhores condições determinadas no Estudo II) de forma a obter um “hidromel doce” e outro “seco” .....	56
III.1    Produção de “hidromel doce” .....	57
III.2.    Produção de “hidromel seco” .....	58
III.3    Provas organolépticas – Análise Estatística .....	60
<b>Capítulo IV: Conclusões Finais.....</b>	<b>63</b>
CONCLUSÕES FINAIS .....	64
<b>Capítulo V: Referências Bibliográficas.....</b>	<b>66</b>
<b>Capítulo IV: Anexos .....</b>	<b>72</b>

## RESUMO

A região de Trás-os-Montes é uma das grandes produtoras de mel no país. No entanto, existe dificuldade em escoar a produção surgindo o hidromel como uma alternativa possível para ultrapassar este problema. Contudo, a produção artesanal do hidromel não tem sido bem sucedida, devido a problemas durante a fermentação e até mesmo após a sua finalização. Desse modo, é necessária a optimização do processo de fermentação de hidromel de forma a facilitar a sua produção, para que se obtenha uma bebida com graduação alcoólica e doçura com características sensoriais particulares e agradáveis.

Desta forma, este trabalho pretendeu dar um contributo nesse sentido. Realizaram-se três estudos onde se pretendeu designadamente: I) avaliar o efeito da passagem da escala laboratorial à piloto, II) avaliar o efeito da temperatura e concentração de nutrientes, na produção de hidromel, com duas estirpes comerciais de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando um desenho experimental e III) produzir hidromel com diferentes teores de açúcar e de álcool, os quais fossem avaliados por um painel de consumidores.

Verificaram-se algumas diferenças ao nível do rendimento em etanol relativamente aos açúcares consumidos e das concentrações finais de etanol e ácido acético aquando da passagem da escala laboratorial para a escala piloto. Pelo desenho experimental verificou-se que na produção futura de hidromel, aconselha-se o uso da levedura Fermol<sup>®</sup> Reims Champagne e uma temperatura entre os 24°C e os 29°C, bem como uma concentração de sais entre 85 e 100 g/hL. Adicionalmente, verificou-se através de um painel de consumidores que o “hidromel doce” é o mais apreciado em termos organolépticos, independentemente do seu teor alcoólico.

## ABSTRACT

The region of Trás-os-Montes is one of most important for honey production; however, it is difficult to sell all of this production, being mead a possible alternative to overcome this problem. Nevertheless, handmade production of mead has not been successful due to problems during fermentations and even after its finishing. Thus, it is necessary to optimize the fermentation process of mead to facilitate their production in order to obtain a beverage with an alcohol and sweetness with particular sensory characteristics and enjoyable.

Thus, this work aims to contribute to these aspects. Three studies were performed where it was intended to: I) Evaluate the effect of changing from laboratory scale to pilot scale; II) Evaluate the effect of temperature and concentration of nutrients in the production of mead, with two commercial strains of *Saccharomyces cerevisiae*, using a experimental design; and III) Perform mead production with different contents of sugar and alcohol, which were evaluated by a panel of consumers.

There were some differences in the yield of ethanol in the case of sugar consumed and the final concentrations of ethanol and acetic acid during the changing transition from laboratory to pilot scale. For the experimental design it was verified that in the future production of mead, it is advisable to use the yeast Fermol<sup>®</sup> Reims Champagne and temperatures between 24° and 29° C, and a salt concentration between 85 and 100 g/hL. Finally, it was verified by a consumer panel that the "sweet mead" is most appreciated in sensory terms, regardless of alcohol content.

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1</b> – Biorreactor onde decorreram as fermentações à escala laboratorial.	23
<b>Figura 2</b> – Cubas de inox onde decorreram as fermentações à escala piloto.	29
<b>Figura 3</b> – Dados a ter em consideração no cálculo da quantidade de aguardente a adicionar às cubas de fermentação para obter um hidromel doce.	30
<b>Figura 4</b> – Cálculos realizados para determinar a quantidade de aguardente vínica a adicionar às cubas de fermentação.	31
<b>Figura 5</b> –Evolução das fermentações na produção de hidromel às escalas laboratorial (A) e piloto (B).	35
<b>Figura 6</b> – Fermentações a diferentes temperaturas e concentrações de sais para a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Fermol® Reims Champagne (Pascal Biotech®) (condições A, B, C, D e E).	40
<b>Figura 7</b> – Fermentações a diferentes temperaturas e concentrações de sais para a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ICV® D47 (condições A, B, C, D e E).	41
<b>Figura 8</b> – Representação da interacção entre os diversos níveis de temperatura e da massa de nutrientes (sais Enovit) por 1,25 L, na produção de etanol para a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Fermol® Reims Champagne (Pascal Biotech®) (A) e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ICV® D47 (B).	50
<b>Figura 9</b> – Representação da interacção entre os diversos níveis de temperatura e da massa de nutrientes (sais Enovit) por 1,25 L, na produção de ácido acético para a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Fermol® Reims Champagne (Pascal Biotech®) (A) e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ICV® D47 (B).	51
<b>Figura 10</b> – Representação da interacção entre os diversos níveis de temperatura e da massa de nutrientes (sais Enovit) por 1,25 L, na produção de glicerol para a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Fermol® Reims Champagne (Pascal Biotech®) (A) e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ICV® D47 (B).	52
<b>Figura 11</b> – Representação da interacção entre os diversos níveis de temperatura e da massa de nutrientes (sais Enovit) por 1,25 L, na concentração final de glucose para a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Fermol® Reims Champagne (Pascal Biotech®) (A) e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ICV® D47 (B).	53
<b>Figura 12</b> – Representação da interacção entre os diversos níveis de temperatura e da massa de nutrientes (sais Enovit) por 1,25 L, na concentração final de frutose para a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Fermol® Reims Champagne (Pascal Biotech®) (A) e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ICV® D47 (B).	54



<b>Figura 13</b> – Desenvolvimento da fermentação na produção de “hidromel doce”.	<b>58</b>
<b>Figura 14</b> – Desenvolvimento da fermentação na produção de “hidromel seco”.	<b>59</b>
<b>Figura 15</b> – Representação gráfica da apreciação global dos consumidores, considerando o teor em açúcar e o teor alcoólico do “hidromel”.	<b>62</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
<b>Tabela 1-</b> Variáveis independentes utilizadas neste estudo.	27
<b>Tabela 2</b> – Condições experimentais testadas na produção de hidromel.	27
<b>Tabela 3</b> – Parâmetros determinados nas fermentações alcoólicas realizadas no biorreactor de 1,5 L (escala laboratorial) e em cuba de inox de 20 L (escala piloto).	36
<b>Tabela 4</b> – Concentrações finais (g/L) de glucose, frutose, etanol, ácido acético e glicerol, para a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Fermol <sup>®</sup> Reims Champagne (Pascal Biotech <sup>®</sup> ), determinadas nos diferentes ensaios do desenho experimental.	43
<b>Tabela 5</b> – Concentrações finais (g/L) de glucose, frutose, etanol, ácido acético e glicerol, para a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ICV <sup>®</sup> D47, determinadas nos diferentes ensaios do desenho experimental.	44
<b>Tabela 6</b> – Coeficientes das regressões, nível de significância (p), R <sup>2</sup> e valores F dos modelos para predizer o etanol (y <sub>1</sub> , y' <sub>1</sub> ), o ácido acético (y <sub>2</sub> , y' <sub>2</sub> ), o glicerol (y <sub>3</sub> , y' <sub>3</sub> ), a glucose (y <sub>4</sub> , y' <sub>4</sub> ), e a frutose (y <sub>5</sub> , y' <sub>5</sub> ), para as leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Fermol <sup>®</sup> Reims Champagne (Pascal Biotech <sup>®</sup> ) e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ICV <sup>®</sup> D47.	47
<b>Tabela 7</b> – ANOVA para o modelo quadrático da RSM.	48
<b>Tabela 8</b> – Comparação das produções de “hidromel doce” e “seco” em relação a alguns parâmetros específicos.	60
<b>Tabela 9</b> – Médias gerais dos parâmetros sensoriais avaliados nas provas organolépticas do hidromel.	61
<b>Tabela 10</b> – Correlações determinadas entre o álcool, apreciação global, aroma, doçura e sabor.	61
<b>Tabela 11</b> – Efeito do teor alcoólico e do teor em açúcar no aroma, doçura, sabor, álcool e apreciação global do hidromel.	62

# Capítulo I

## *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO GERAL AO TEMA E PRINCIPAIS OBJECTIVOS DO TRABALHO

A apicultura é uma actividade com impactos significativos positivos, tanto sociais como económicos. É uma das actividades mais antigas e importantes do mundo, ligada à produção de mel, geleia real, própolis, cera e pólen.

O mel é um produto natural utilizado pelo homem desde os tempos mais remotos, sendo actualmente o seu aproveitamento visto como uma possível alternativa na produção de novos produtos.

Trás-os-Montes é uma das regiões com maior produção de mel do país. No entanto, a região tem tido dificuldade em escoar a produção de mel devido à concorrência nacional e internacional. A apicultura é uma das grandes opções para a agricultura transmontana, sendo uma oportunidade de aproveitamento da potencialidade natural do meio ambiente e da sua capacidade produtiva. Torna-se assim relevante encontrar alternativas para que a apicultura se torne ainda mais uma actividade viável, valorizando-se o mel nacional e aumentando os proveitos da região. A produção de hidromel poderá ser uma das possibilidades, valorizando a região e aumentando os ganhos dos apicultores. Contudo, apesar do hidromel ser uma das bebidas alcoólicas mais antigas, não é produzido de forma padronizada, mas sim de forma empírica e artesanal. Desse modo, é essencial rentabilizar o seu processo de produção, analisando e encontrando soluções para que a produção seja praticável, e o produto final possua qualidade.

Nesse sentido, este trabalho teve como principal objectivo dar um contributo para a resolução desses problemas, pretendendo-se avaliar a forma como determinadas condições de produção afectaram a qualidade final do hidromel obtido. Especificamente, com o presente trabalho pretendeu-se:

1. Avaliar o efeito da passagem da escala laboratorial à escala piloto aquando do fabrico do hidromel, tanto a nível da performance da fermentação, como em termos das características finais do hidromel obtido;

2. Avaliar o efeito da temperatura, da quantidade de nutrientes e das estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na produção de hidromel, utilizando-se um desenho factorial;

3. Produzir hidromel à escala piloto segundo as melhores condições determinadas no estudo anterior, produzindo-se após diferentes períodos de fermentação seguidos de aguardentação um “hidromel doce” e outro “seco”, com diferentes teores alcoólicos e conhecer a opinião de um grupo de consumidores sobre a qualidade dos mesmos.

## 2. INTRODUÇÃO

### 2.1. O MEL

Inúmeros estudos indicam que o mel já existe aproximadamente há 42 milhões de anos. Há evidências do seu uso na pré-história, através de pinturas em rochas que retratam abelhas e favos. O mel é um produto natural muito apreciado, sendo uma das formas concentrada de açúcar disponível no mundo inteiro (FAO, 1996). Segundo o Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro, o mel é por definição uma “*substância açucarada natural, produzida por abelhas produtoras de mel (Apis mellifera) a partir do néctar de plantas ou a partir de secreções de partes vivas de plantas ou secreções de insectos sugadores de plantas em partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam por combinação com substâncias que elas próprias produzem, depositam, desidratam e armazenam nas colmeias para posterior maturação*”. O néctar pode provir de uma única flor (mel monofloral) ou de várias (mel multifloral), podendo o primeiro não ser rigorosamente monofloral devido à presença de outro néctar em pequena quantidade, não interferindo apreciavelmente no seu aroma, cor e sabor.

Devido ao seu alto teor de açúcar, o mel é usado como conservante de alimentos (Cherbuliez and Domerego, 2003), sendo também uma excelente opção nutricional devido aos seus benefícios demonstrados para a saúde (Cuevas-Glory *et al.*, 2007), a nível do efeito bactericida, anti-séptico, anti-reumático, diurético, digestivo, prevenção de gripes e constipações, etc.

#### 2.1.1 Composição e propriedades físico-químicas

A composição do mel é bastante variável e depende primariamente da sua origem floral. No entanto, outros factores externos podem ter influência, tais como factores sazonais, ambientais e de processamento (Anklam, 1998; Al-Mamary *et al.*,

2002; Azeredo *et al.*, 2003; Arráez-Román *et al.*, 2006; Baltrušaitytė *et al.*, 2007; Küçük *et al.*, 2007).

O mel é constituído por um elevado número de substâncias (cerca de 181 compostos) (Arráez-Román *et al.*, 2006), sendo uma mistura complexa de carboidratos, dos quais os açúcares redutores, frutose e glucose, são os principais constituintes (85-95%) (White, 1975). Outras substâncias estão também presentes em pequenas quantidades, tais como, sais minerais, proteínas, vitaminas, ácidos orgânicos, flavonóides, ácidos fenólicos, enzimas e outros fitoquímicos (Alvarez-Suarez *et al.*, 2010). Alguns destes compostos são conhecidos por terem propriedades antioxidantes (Gheldof *et al.*, 2002).

A proporção de glucose e frutose presente no mel depende particularmente da fonte de néctar, podendo influenciar o seu *flavour*, uma vez que a frutose é mais doce do que a glucose, assim como a sua granulação, visto que a glucose é menos solúvel em água do que a frutose (de Rodríguez *et al.*, 2004; Finola *et al.*, 2007). Os restantes hidratos de carbono incluem a maltose, a sacarose e outros carboidratos complexos.

O pH do mel pode variar entre 3,4 e 6,1, sendo a média de 3,9. A sua cor varia entre quase incolor a castanho-escuro (Codex Alimentarius, 2001), dependendo da sua origem floral, processamento, armazenamento, factores climáticos durante o fluxo do néctar e a temperatura à qual o mel amadurece na colmeia (Smith, 1967). Além disso, quanto mais escuro for o mel, mais rico será em minerais. Contudo, geralmente este é mais desvalorizado economicamente, uma vez que os méis claros são mais aceites no mercado mundial.

O mel, quanto à consistência, pode ser fluido, viscoso, parcialmente ou completamente cristalizado, dependendo da composição, temperatura e teor em água (Abu-Jdayil *et al.*, 2002).

A qualidade do mel é principalmente determinada pelas características sensoriais, físicas, químicas e microbiológicas. Os critérios de qualidade físico-química do mel encontram-se bem definidos na Directiva CE nº 2001/110 de 20 de Dezembro de 2001.

## 2.2 HIDROMEL

Estima-se que a produção mundial de mel seja superior a 1.200.000 toneladas por ano. A produção em Portugal abrange milhares de produtores, representando uma

fatia importante na economia nacional e, principalmente, regional. No entanto, na região Transmontana verifica-se um excesso de mel comercializado a preços abaixo dos custos de produção, sendo importante encontrar alternativas para que a apicultura se torne uma actividade viável.

A produção de hidromel é uma das possíveis soluções para este problema. O hidromel é uma bebida alcoólica que contém entre 8-18% de álcool por volume, sendo produzido através da fermentação, realizada por leveduras (Navrátil *et al.*, 2001), de uma solução diluída de mel, obtida através da adição de uma quantidade de água adequada.

O hidromel pode ser classificado em seco, licoroso, doce e espumoso, segundo a sua tecnologia de fabrico. Esta produção depende do tempo de fermentação, da quantidade de mel utilizada e da graduação alcoólica resultante da adição de aguardente vínica.

Ao contrário das uvas, que contêm fermentos à sua superfície, no mel isso não ocorre com frequência. Por isso, são adicionadas leveduras, para maior segurança e controle na produção de hidromel. As leveduras conferem aromas diversos à bebida, mas também podem produzir diferentes teores alcoólicos na bebida final e fermentar de forma diferenciada os açúcares, resultando daí diferentes teores de açúcar residual.

As leveduras utilizadas na produção de hidromel são normalmente estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizadas na produção de vinho, cerveja e champagne. Estas leveduras actuam sobre açúcares como a glucose e a frutose, resultando na formação de etanol e dióxido de carbono.

### **2.2.1 Problemas inerentes ao processo de produção de hidromel**

Devido ao elevado teor em açúcares, o processo fermentativo é bastante moroso, sendo a variedade do mel, a estirpe da levedura, os nutrientes disponíveis e o pH do meio (Navrátil *et al.*, 2001), variáveis importantes que afectam a produção e qualidade do produto final.

Os atrasos e amuos nas fermentações, bem como a produção de *flavours* indesejados, são alguns dos problemas encontrados na produção de hidromel, normalmente associados com a incapacidade de resposta das leveduras para se adaptar às condições de *stress* desfavoráveis ao seu crescimento (Attfield, 1997; Bisson, 1999),

causando efeitos negativos na comercialização do produto. Uma condição de *stress* é qualquer factor ambiental que possa exercer um efeito adverso no crescimento celular (Ivorra *et al.*, 1999). Alguns dos possíveis factores de *stress* são o choque térmico (calor ou frio), as limitações de nutrientes essenciais, o *stress* osmótico, o *stress* oxidativo, a privação de azoto e a toxicidade ao etanol (Bauer and Pretorius, 2000; Hohmann and Mager, 2003). As células devem detectar e responder a estes factores para que a fermentação não seja afectada negativamente (Zuzuarregui and del Olmo, 2004). Assim, a análise da resistência ao *stress* pode ser usada como critério para a selecção de leveduras enológicas, uma vez que existe uma relação entre o desempenho fermentativo das leveduras e a resistência a essas condições (Zuzuarregui and del Olmo, 2004). Numa fermentação alcoólica procura-se, também, uma produção reduzida de dióxido de enxofre, de espuma, de sulfureto de hidrogénio e de acidez volátil, bem como um bom perfil enzimático (actividades elevadas de  $\beta$ -glucosidase proteolítica), produção baixa de acetaldeído e ausência de produção de aminas biogénicas.

Tal como mencionado anteriormente, os baixos níveis de substâncias azotadas e de minerais presentes no mel, indispensáveis para a multiplicação das leveduras e o pH ácido do caldo fermentativo afectam negativamente a evolução do processo. Assim, é vantajoso um controlo rigoroso das condições de fermentação. De todos os nutrientes assimilados pelas leveduras durante a fermentação, os compostos azotados são quantitativamente os mais importantes, depois dos compostos carbonados, pois são essenciais para o crescimento e metabolismo das leveduras (Casellas, 2005). A quantidade de azoto disponível para as leveduras depende das fontes de azoto assimilável presentes no mosto e da concentração de etanol, que afecta negativamente a assimilação do azoto. O aumento da concentração de etanol e o uso progressivo das fontes de azoto pelas leveduras ao longo da fermentação, pode conduzir à privação de azoto e consequentemente a condições de *stress* (Ivorra *et al.*, 1999). Um fornecimento inadequado de azoto assimilável no meio de fermentação pode levar ao crescimento deficiente da levedura, a fermentações prolongadas, a taxas de crescimento reduzidas e consequentemente a um decréscimo da produtividade. Adicionalmente, a qualidade organoléptica do produto pode deteriorar-se devido ao catabolismo de aminoácidos e péptidos causando a formação de sulfureto de hidrogénio (H<sub>2</sub>S), de determinados ésteres e de padrões alterados de diacetil (O'Connor-Cox and Ingledew, 1991). Os requisitos mínimos de azoto são ditados pela taxa de crescimento da levedura desejada nesse meio.



Outro problema é a falta de uniformidade no produto final, resultante de mudanças no teor de água no mel produzido em diferentes anos. Segundo o Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro, o máximo admissível é de 20% de teor de água no mel, excepto para o mel *Calluna*, que é de 23%. Logo, a quantidade de água adicionada inicialmente tem que ser ajustada para se obter o teor alcoólico pretendido no produto final. A diferença de teores entre os açúcares (glucose e frutose) também pode influenciar o processo de fermentação, já que as estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* metabolizam preferencialmente a glucose, sendo consumida mais rapidamente, resultando numa predominância de frutose no produto final (Fleet 1998; Berthels *et al.*, 2004). No final da fermentação, quando as fontes de azoto são consumidas e as concentrações de etanol são elevadas, algumas estirpes também tem dificuldades em fermentar a frutose restante (Bauer and Pretorius, 2000). Esta falta de uniformidade pode induzir refermentações não só por leveduras, mas também pela metabolização do açúcar residual por bactérias acéticas e bactérias lácticas. Isto aumenta a acidez volátil e a produção anormal de ésteres, alterando as características organolépticas e a qualidade do produto final (O' Connor and Ingledew-Cox, 1991). Actualmente, o hidromel continua a ser elaborado de forma empírica, não sendo tidos em conta estes ajustes, obtendo-se bebidas muito distintas. Além disso, em inúmeras situações verifica-se que misturas de mel com aguardente vínica do tipo licor, são vendidas sob o rótulo de "hidromel". No entanto, essas bebidas não resultaram de qualquer tipo de fermentação.

Adicionalmente, deve ser referido que as etapas de clarificação e filtração desejáveis no final da produção tornam o processo extremamente caro.

## 2.3 OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO ASSOCIADAS À ELABORAÇÃO DE HIDROMEL

As condições dos processos de fermentação comercial, tais como o pH, a temperatura e os componentes do meio, geralmente não são divulgados, mas sujeitos a sigilo absoluto (Zhang and Greasham, 1999). O "meio de fermentação ideal" não se encontra bem definido (Zabriskie *et al.*, 1982) e o "desenvolvimento do meio de fermentação é uma mistura de arte e ciência". A optimização do meio de fermentação representa um custo significativo e implica tempo para o desenvolvimento do bioprocesso (Kennedy *et al.*, 1994). O objectivo da optimização é determinar as

condições adequadas em termos de pH, temperatura, composição do meio, etc, de forma a maximizar ou minimizar económica e tecnologicamente as variáveis importantes do processo, tais como o rendimento do processo, a concentração do produto e os custos.

Os modelos matemáticos utilizados na concepção de processos de optimização e controle, são ferramentas bastante úteis nesse domínio. De forma a ultrapassar os problemas associados à elaboração do hidromel mencionados anteriormente, no processo de produção desta bebida poderá ser vantajoso proceder à optimização de alguns parâmetros, de forma a desenvolver-se uma fermentação eficiente. Uma vez estabelecidos os parâmetros a ser optimizados, pode recorrer-se a uma metodologia que permita determinar as melhores condições do processo, prevenindo problemas que possam decorrer durante a fermentação.

Recentemente, vários métodos estatísticos de desenho experimental têm sido empregues no desenvolvimento, melhoramento e optimização de bioprocessos. O delineamento experimental (DE) conjuga conhecimentos técnicos e estatísticos para planear um determinado ensaio ou uma série de ensaios, cujas variáveis em estudo afectem as características de um dado produto, tendo como objectivo determinar a magnitude das alterações, detectar interacções e prever combinações óptimas. Resumidamente, é um ensaio com dois ou mais factores, tendo cada um valores ou níveis diferentes, e cujas unidades experimentais cobrem todas as possíveis combinações desses níveis de todos os factores. Este tipo de ensaio permite o estudo do efeito de cada factor sobre a variável resposta, bem como o efeito das interacções entre factores sobre a dita variável.

A “metodologia de superfície de resposta” ou em inglês “Response surface methodology” (RSM), originalmente descrita por Box and Wilson (1951), é adequada para identificar o efeito de variáveis individuais e procurar as melhores condições para um sistema multivariável. A construção de modelos de superfície de resposta é um processo iterativo. Quando um modelo aproximado é obtido, um bom ajuste do mesmo determina se o resultado é satisfatório. Caso contrário, o processo de aproximação é reiniciado e mais ensaios são feitos, ou o modelo evolui com parâmetros diferentes. A RSM é importante na concepção, formulação, desenvolvimento e análise de novos produtos e estudos científicos, sendo também eficaz na melhoria dos já existentes.

Basicamente, esta optimização do processo envolve três etapas principais: realizar ensaios planeados, estimar os coeficientes de um modelo matemático, prever a resposta e verificar a adequação do modelo (Yu *et al.*, 2009).

A principal vantagem deste método é reduzir o número de experiências requeridas, mesmo quando um grande número de variáveis está envolvido, sendo menos trabalhoso e demorado do que outros métodos (Chung *et al.*, 2000; Wu, 2002).

Com a RSM é possível determinar as condições operacionais que favorecem a obtenção de um alto rendimento e uma boa produtividade (Costa *et al.*, 2001).

Este método tem sido aplicado na modelação e optimização de processos bioquímicos e biotecnológicos, relacionados com os sistemas de alimentação (Cacace and Mazza, 2003b; Parajo *et al.*, 1995; Senanayake and Shahidi, 1999; Senanayake and Shahidi, 2002; Telez-Luis *et al.*, 2003; Vasquez and Martin, 1998) e para determinar os efeitos de diversas variáveis e optimizar as suas condições (Ginevra *et al.*, 2002; Levigne *et al.*, 2002; Li and Fu, 2005; Tanyildizi *et al.*, 2005; Vohra e Satyanarayana, 2002; Ozer *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2000). Como exemplos práticos refira-se a optimização da composição de meios de fermentação, (Mao *et al.*, 2005; Wang and Lu, 2005), assim como os efeitos das variáveis ambientais no crescimento de leveduras (D'Amato *et al.*, 2006; Arroyo-López *et al.*, 2006), a obtenção dos valores óptimos de parâmetros, tais como, pH, temperatura, arejamento (Dennis and Webster, 1971), taxas de alimentação (Elad *et al.*, 1982), condições de hidrólise enzimática e processos de fabrico de alimentos (Mao *et al.*, 2005), etc. Esta técnica também tem sido empregue para optimizar a produção de enzimas por microrganismos (Ridout *et al.*, 1986).

## Capítulo II

### *Material e Métodos*

### 3. DESCRIÇÃO GERAL DOS ESTUDOS REALIZADOS

De forma a adquirir conhecimentos úteis para a produção de um hidromel de qualidade por pequenos produtores de mel que estejam interessados na elaboração desta bebida, no presente trabalho realizaram-se três estudos designadamente:

I. Produção de hidromel a diferentes escalas: escala laboratorial e escala piloto.

II. Análise do processo de fermentação em relação aos factores, temperatura e concentração de nutrientes adicionados ao mosto, para duas estirpes comerciais de *Saccharomyces cerevisiae*, através de um desenho experimental.

III. Produção de hidroméis à escala piloto, segundo as melhores condições determinadas no estudo anterior de forma a obter um “hidromel doce” e outro “seco”.

#### **Estudo I) Produção de hidromel às escalas laboratorial e piloto – ensaios preliminares**

Nesta primeira fase avaliou-se a produção de hidromel a diferentes escalas: escala laboratorial e escala piloto, de forma a determinar a sua importância no processo de fermentação e na qualidade do produto final.

##### **I.1. Microrganismo utilizado e preparação dos mostos**

A escolha da levedura a utilizar no presente trabalho teve em conta resultados obtidos num estudo anterior realizado por Pereira *et al.* (2009). Neste, algumas estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, designadamente, estirpes isoladas do mel, uma de referência e uma comercial, foram avaliadas, comparando-se a sua resistência ao: i) sulfuroso (uma vez que é uma característica desejável nas estirpes de leveduras usadas em fermentações, cujo objectivo seja a obtenção de bebidas alcoólicas); ii) etanol, considerando que a tolerância das estirpes a este álcool é um factor imprescindível devido às concentrações elevadas que este álcool atinge durante a fermentação (Carrasco *et al.*, 2001); iii) e *stress* osmótico, visto que é uma condição adversa para as leveduras no início da fermentação, e mais precisamente na produção de hidromel,

tendo em conta que o mel tem um teor de açúcares elevado. Nesse mesmo estudo foram utilizados dois tipos de mel (um claro e um escuro) enriquecidos com um suplemento comercial.

As estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas do mel e a estirpe comercial deram resultados semelhantes, demonstrando todas serem adequadas para a produção de hidromel. Em relação ao tipo de mel, a utilização de mel escuro forneceu melhores resultados comparativamente ao mel claro. Esta diferença pode ser devido a uma percentagem de pólen mais reduzida no mel claro comparativamente ao mel escuro, uma vez que a maioria dos compostos azotados estão presentes no pólen, podendo o teor em azoto ser o factor limitante da fermentação. Além disso, o mel escuro também apresenta uma concentração mais elevada de minerais, o que também poderá ter um papel positivo na fermentação.

Desta forma, em todos os ensaios do presente trabalho foi utilizado o mel escuro e a estirpe *Saccharomyces cerevisiae*, levedura enológica comercial “Fermol<sup>®</sup> Reims Champagne (Pascal Biotech<sup>®</sup>)”, recomendada para a produção de vinhos brancos, de forma a facilitar a sua futura aquisição pelos apicultores e há maior “estabilidade” da mesma face às estirpes isoladas do mel.

Seguindo as instruções da embalagem, a levedura foi hidratada (30g/hL) em água açucarada (50g/L) e colocada em banho maria a 35°C durante vinte minutos.

O mosto foi preparado através da diluição do mel (395g/L), enriquecido com nutrientes comerciais (Enovit<sup>®</sup>) (60g/hL) e posterior adição de SO<sub>2</sub> (8g/hL) a 6% (v/v) e ácido tartárico (Sigma-Aldrich) até se obter um pH de 3,5. A escolha da diluição de mel utilizada no trabalho teve em conta que se pretendia obter uma bebida com 14% de etanol. Considerando que para se obter esta concentração no mosto do mel deveriam estar presentes 252 g/L de açúcares e que no mel a sua concentração ronda os 63,8% (m/m), a diluição a realizar seria aproximadamente de 790 g de mel em dois litros de água. Em relação à composição dos nutrientes comerciais refira-se que estes continham sulfato de amónio a 70% (m/m), fosfato de amónio dibásico a 19,80% (m/m), coadjuvante de filtração a 10% (m/m) e vitamina B1 a 0,20% (m/m).

## **I.2 Fermentação do mosto à escala laboratorial**

A fermentação à escala laboratorial realizou-se num biorreactor de cinco litros, utilizando-se um volume de 1, 5 litros (Figura 1).



Figura 1 – Biorreactor onde decorreram as fermentações à escala laboratorial.

A levedura comercial depois de previamente hidratada foi adicionada ao meio de crescimento. Desta forma iniciou-se a fermentação que decorreu à temperatura de 25°C, com agitação suave (120 rpm) por trezentas e cinquenta horas. Durante a fermentação, o pH e a temperatura foram constantemente monitorizados através de um eléctrodo de pH e sonda de temperatura, respectivamente. A biomassa foi determinada periodicamente por densidade óptica a 640 nm num espectrofotómetro de luz visível (Jenway Genova®). Quando necessário procedeu-se à diluição das amostras. Para as leituras da densidade óptica foi usado como branco, o meio de crescimento sem a inoculação da levedura. Para avaliar o desenrolar da fermentação, periodicamente retiraram-se 2 mL de amostra para quantificação da glucose, frutose, etanol, glicerol e ácido acético, por cromatografia em fase líquida de alta performance e por detecção de índice refractivo (HPLC-IR). As amostras foram filtradas através de uma seringa, com um filtro de nylon de porosidade 0,2 µm (Whatman). Quando necessário, o sobrenadante foi congelado a -18°C (Templow P Selecta®) para análise posterior.

Esta fermentação foi efectuada em duplicado.

### **I.3 Fermentação do mosto à escala piloto**

Após a produção de hidromel à escala laboratorial procedeu-se à produção de hidromel à escala piloto, utilizando-se para tal uma cuba de inox de vinte e cinco litros, tendo sido o volume de trabalho de vinte litros.

A estirpe comercial de *Saccharomyces cerevisiae*, anteriormente referida, foi a utilizada neste estudo. Depois de previamente hidratada, foi colocada no mosto de hidromel similarmente ao que se descreveu anteriormente. Ao longo da fermentação, o pH e a temperatura foram também determinados. A fermentação decorreu em torno dos 25°C por 350 horas e determinaram-se os parâmetros referidos no ponto anterior. Refira-se que esta cuba não apresentava manta ou camisa de aquecimento, ao contrário do biorreactor anterior, sendo, por isso, mais difícil controlar a temperatura. No entanto, a temperatura da sala onde a cuba permaneceu manteve-se à volta dos 25°C por se tratar da época de Verão.

### **I.4 Quantificação de glucose, frutose, glicerol e ácido acético**

A glucose, frutose, etanol, glicerol e ácido acético foram analisados num sistema HPLC Varian, equipado com um injetor Rheodyne de 20 µL e uma coluna da Supelco Gel C-610H (300 x 7,8 mm) a 35°C, e acoplado a um detector de índice refractivo, RI-4 da Varian. A fase móvel utilizada consistiu em ácido fosfórico a 0,1% (v/v) com um caudal de 0,5 mL/min. Os dados foram gravados e integrados pelo sistema informático Star Chromatography Workstation da Varian.

A glucose, frutose, etanol, glicerol e ácido acético foram quantificados com base na área dos seus picos e pela comparação com curvas de calibração obtidas com os padrões correspondentes.

## **Estudo II) Análise do processo de fermentação em relação aos factores, temperatura e concentração de nutrientes adicionados ao mosto, para duas estirpes comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* através de um desenho experimental**

Apesar de no Estudo I) se verificar que as fermentações conduzidas à escala laboratorial deram resultados ligeiramente diferentes dos obtidos à escala piloto, o presente estudo foi realizado à escala laboratorial, pois em termos de custos de



reagentes e material era o mais adequado e razoável, face ao número elevado de fermentações que foram necessárias realizar e que se passam a descrever nas secções seguintes.

## **II.1 Microrganismos utilizados e preparação dos mostos**

Nos ensaios do desenho experimental utilizaram-se duas estirpes comerciais de *Saccharomyces cerevisiae*, designadamente a Fermol<sup>®</sup> Reims Champagne (Pascal Biotech<sup>®</sup>) (já utilizada no Estudo I) e a ICV<sup>®</sup> D47, ambas adequadas para a produção de vinho branco.

As leveduras foram hidratadas (30g/hL) em água açucarada (50g/L) e colocadas em banho maria a 35°C por vinte minutos.

O mosto foi preparado através da diluição do mel em água (395g/L), enriquecido com nutrientes comerciais (Enovit<sup>®</sup>) e posterior adição de SO<sub>2</sub> (8g/hL) a 6% (v/v) e ácido tartárico (Sigma-Aldrich) até se obter um pH de 3,5. Como se pretendia avaliar o efeito da concentração de nutrientes adicionados, prepararam-se diversos mostos com três concentrações nestes sais, designadamente 60, 90 e 120g/hL.

## **II.2 Fermentações**

As fermentações decorreram em Erlenmeyers de 500 ml, utilizando-se um volume final de 250 ml. As leveduras comerciais depois de previamente hidratadas foram adicionadas aos mostos. Iniciaram-se as fermentações que decorreram às temperaturas de 20, 25 e 30°C, e com as concentrações de sais de 60, 90 e 120 g/hL, indicadas pelo desenho experimental. A duração das fermentações foi de duzentas e dezasseis horas (aproximadamente 15 dias). Todas as fermentações decorreram na incubadora SI50 Stuart Scientific. A determinação da biomassa e a quantificação de glucose, frutose, etanol, glicerol e ácido acético, por HPLC, foram efectuados como mencionado anteriormente nas secções I.2 e I.4.

Cada ensaio foi realizado em duplicado.

## **II.3 Desenho experimental**

Para estudar o efeito da temperatura e da concentração de sais para cada uma das leveduras enológicas utilizadas na produção de hidromel utilizou-se um desenho

factorial 3<sup>2</sup>. Os dados experimentais foram analisados pelo método RSM, usando o software “Minitab 15.0”.

Segundo esta metodologia a relação entre as variáveis dependentes e as operacionais foi estabelecida através de um modelo que inclui termos lineares, interactivos e quadráticos do tipo:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2$$

onde  $y$  é a variável dependente;  $b$  corresponde aos coeficientes da regressão (calculados através dos dados experimentais por regressões múltiplas usando o método dos mínimos quadrados), e o  $x$  corresponde às variáveis independentes. Em relação ao parâmetro  $b$ : i)  $b_0$  é uma constante; ii)  $b_1$  e  $b_2$  são os coeficientes lineares; iii)  $b_{11}$  e  $b_{22}$  são os coeficientes quadráticos; e iv)  $b_{12}$  é o coeficiente de interacção entre as variáveis 1 e 2.

As variáveis independentes usadas neste estudo, temperatura e concentração de nutrientes – Sal Enovit, encontram-se descritas na Tabela 1. A escolha dos diferentes níveis de temperatura teve em conta que a *Saccharomyces cerevisiae* apresenta uma taxa de fermentação mais elevada para temperaturas entre os 20°C e os 30°C, sendo que abaixo de 15°C a taxa fermentativa diminui significativamente e ocasiona longos tempos de fermentação. Para temperaturas acima de 30°C a taxa de fermentação também diminui.

A escolha das diferentes concentrações de nutrientes baseou-se no facto de as leveduras necessitarem da adição destes sais, de forma a que o processo fermentativo não seja moroso, mas mais rápido. Os níveis estabelecidos para esta variável teve em consideração o facto de no Estudo I) se ter utilizado as 60g/hL e as fermentações terem decorrido favoravelmente. Dessa forma, pareceu ser adequado o seu aumento para 90 e 120 g/hL, permitindo avaliar se este aumento seria ou não necessário.

Neste trabalho utilizou-se o “central composite design” e especificou-se que  $\alpha$  fosse igual a 1, de forma a que não fossem testados pontos axiais exteriores à zona considerada como “segura”. De facto, é conhecido que temperaturas inferiores a 20°C ou superiores a 30°C, não favorecem o bom desenvolvimento das fermentações e que concentrações inferiores a 60g/hL de sais também acarretam amuos.

Tabela 1- Variáveis independentes utilizadas neste estudo.

Variável	Nomenclatura	Unidades	Níveis
Temperatura	T	°C	20-25-30
Concentração de Nutrientes – Sal Enovit	C	g/hL	60-90-120

Variável codificada adimensional	Nomenclatura	Definição	Amplitude de variação
Temperatura	$x_1$	$(T-25)/5$	$(-1,1)$
Concentração de Nutrientes – Sal Enovit	$x_2$	$(C-90)/30$	$(-1,1)$

As variáveis padronizadas adimensionais (codificadas), tendo limites de variação de  $(-1, 1)$ , foram definidas como  $x_1$  (temperatura) e  $x_2$  (concentração de nutrientes). A correspondência entre as variáveis codificadas e não codificadas foi estabelecida por equações lineares deduzidas através das suas respectivas variações limite (Tabela 1).

A Tabela 2 mostra o conjunto de condições experimentais ensaiadas (expressas em termos de variáveis codificadas).

Tabela 2 – Condições experimentais testadas na produção de hidromel.

Ensaio	Temperatura (°C)	Concentração de Nutrientes – Sal Enovit
1	0	1
2	1	-1
3	0	-1
4	-1	-1
5	1	1
6	-1	1
7	0	0
8	-1	0
9	1	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

A sequência foi estabelecida aleatoriamente para limitar a influência dos erros sistemáticos na interpretação de resultados. Refira-se que as experiências de 1 a 9,

permitiram o cálculo dos coeficientes de regressão, enquanto que os ensaios 10 a 12 são réplicas no ponto central do desenho experimental de forma a estimar a influência do erro experimental.

As variáveis dependentes estudadas neste trabalho foram as que geralmente são consideradas como relevantes na produção de bebidas alcoólicas, designadamente o etanol, o ácido acético e o glicerol, bem como as concentrações finais de glucose e frutose.

### **Estudo III) Produção de hidromel à escala piloto segundo as melhores condições determinadas no Estudo II) de forma a obter um “hidromel doce” e outro “seco”.**

Após a análise dos resultados obtidos no desenho experimental, verificou-se que os melhores resultados em termos de etanol, ácido acético, glicerol e açúcares, foram obtidos para concentrações de nutrientes entre 85 e 100 g/hL e temperaturas entre os 24°C e os 29°C. Em relação à estirpe utilizada, a *Saccharomyces cerevisiae* Fermol® Reims Champagne (Pascal Biotech®) forneceu melhores resultados, segundo os critérios de ajuste do desenho factorial, comparativamente à ICV®D47.

Considerando que essas condições são as mais adequadas para a produção de hidromel, procedeu-se à sua execução à escala piloto. Adicionalmente pretendeu-se produzir hidroméis com diferentes teores alcoólicos e níveis de doçura, e avaliar os mesmos em termos organolépticos, recorrendo a um grupo de consumidores.

#### **III.1 Microrganismo**

A estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* Fermol® Reims Champagne (Pascal Biotech®) foi hidratada (30g/hL) em água açucarada (50g/L) e colocada em banho maria a 35°C por vinte minutos.

#### **III.2 Preparação dos mostos**

Na preparação dos mostos utilizou-se a metodologia descrita nas secções anteriores I.1 e II.1, com excepção da concentração de nutrientes comerciais (Enovit®) a 90g/hL.

### III.3 Fermentações à escala piloto

As fermentações foram efectuadas em cubas de inox de 25 litros, usando um volume de trabalho de 20 litros (Figura 2).



Figura 2 – Cubas de inox onde decorreram as fermentações à escala piloto.

Uma vez que a gama de temperaturas óptima, obtida a partir do desenho experimental, se situou entre os 24 e os 29°C, pretendeu-se que as fermentações decorressem nessa gama. Contudo, como as cubas não apresentavam mantas ou camisas de aquecimento/arrefecimento, e uma vez que as fermentações foram realizadas no Verão, a temperatura manteve-se em torno dos 25°C. Durante a fermentação, a temperatura foi periodicamente medida, bem como a densidade e os graus Baumé do mosto através de um areómetro, em cada uma das cubas.

As determinações de biomassa, glucose, frutose, etanol, ácido acético e glicerol foram realizadas de forma idêntica à mencionada anteriormente nas secções I.2 e I.4.

Estas fermentações foram efectuadas em triplicado.

Para produzir os “hidroméis doce” e “seco” procedeu-se da forma descrita seguidamente:

#### ***“Hidromel doce”***

Para se produzir um “hidromel doce”, a fermentação foi interrompida prematuramente, de forma a não ocorrer o consumo total dos açúcares. Pretendeu-se obter uma bebida com cerca de 18° de álcool e uma doçura correspondente a 8° Baumé (valor de referência na vinificação do vinho do Porto). Para se obter um hidromel com

essas características, as fermentações foram interrompidas pela adição de aguardente vínica, no momento em que a densidade era de aproximadamente  $1060 \text{ g/cm}^3$ . A aguardente utilizada continha aproximadamente 77% (v/v) de álcool. A quantidade de aguardente adicionada foi determinada segundo o procedimento descrito por Pato (1982). De forma mais esquematizada, foi necessário ter em consideração os dados indicados na Figura 3.

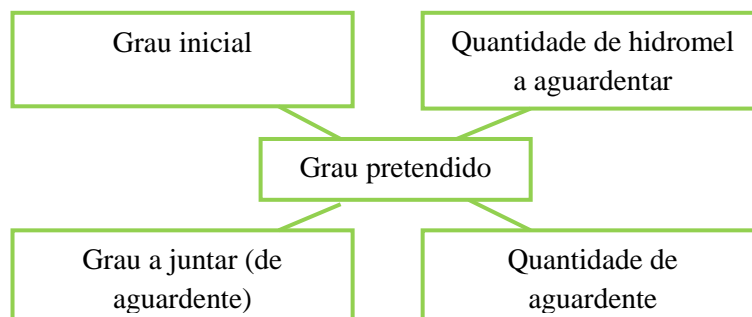
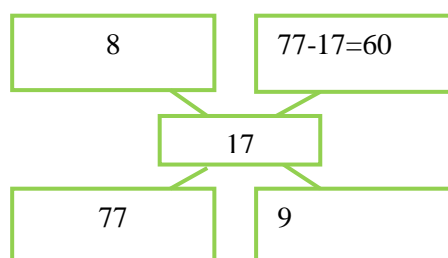


Figura 3 – Dados a ter em consideração no cálculo da quantidade de aguardente a adicionar às cubas de fermentação para obter um hidromel doce.

Quando as fermentações foram interrompidas mediram-se, através de um areómetro, cerca de 8° de álcool nos mostos (Figura 4). Dessa forma, para se obter um hidromel com 17° de álcool (valor posteriormente corrigido para os teores alcoólicos pretendidos), seria necessário adicionar 9 litros de aguardente com álcool a 77% (v/v) a 60 litros de hidromel. Assim sendo, para se obter o “hidromel doce” em cada cuba foram retirados 3 litros de hidromel e adicionados 3 litros de aguardente vínica a 17 litros de hidromel, correspondendo a um volume total de 20 litros. Uma vez que o objectivo seria obter “hidroméis” com diferentes teores alcoólicos, este foi posteriormente dividido e corrigido para 18°, 20° e 22° de álcool.



60 L de hidromel \_\_\_\_\_ 9 L de aguardente

20 L de hidromel \_\_\_\_\_  $\alpha = 3$  L de aguardente

Figura 4 – Cálculos realizados para determinar a quantidade de aguardente vínica a adicionar às cubas de fermentação.

### ***“Hidromel seco”***

Os restantes 3 litros de mosto que se retiraram de cada uma das 3 cubas continuaram a fermentar em três recipientes distintos, para que as leveduras continuassem a consumir os açúcares e a produzir etanol. A temperatura e a densidade foram novamente medidas periodicamente, e a biomassa determinada por densidade óptica como já se referiu anteriormente. Quando se atingiu uma densidade de cerca de  $1020 \text{ g/cm}^3$  foi efectuada a aguardentação.

Seguindo o esquema anterior, determinou-se que para 3 litros de hidromel seria necessário a adição de 360 ml de aguardente vínica, obtendo-se o “hidromel seco”.

No caso do “hidromel seco” também se procedeu à correcção dos teores alcoólicos, nos três recipientes, para 18°, 20° e 22° de álcool.

## **III.4 Provas organolépticas**

Após obtenção dos “hidroméis doce” e “seco” a 18°, 20° e 22° de álcool efectuou-se uma análise sensorial com a colaboração de potenciais consumidores alvo, de forma a conhecer e estudar as reacções e a aceitação do produto.

Com este objectivo foram organizadas três sessões com 36 pessoas numa sala específica para provas, com cabines individualizadas, distribuindo-se 3 amostras de “hidromel doce” a 18°, 20° e 22° de álcool e 3 amostras de “hidromel seco” também a

18°, 20° e 22° de álcool a cada provador. Estas amostras foram servidas de forma aleatória (Anexo 1). Foi pedido aos consumidores para avaliarem cada amostra (de A a F), numa escala de 1 (não gosto nada) a 10 (gosto muito), em relação aos seguintes parâmetros: aroma, sabor, doçura, teor alcoólico e apreciação global (Anexo 2).

### III.5 Análise estatística

Os dados obtidos da apreciação sensorial pelos consumidores, nas provas organolépticas realizadas aos “hidroméis” produzidos com diferentes teores alcoólicos e de doçura, foram analisados com o software “R”<sup>®</sup>. Efectuaram-se os cálculos das estatísticas descritivas e dos coeficientes de correlação linear ( $r$ ) entre as variáveis em estudo. Os efeitos do teor em álcool e do teor em açúcar foram avaliados através do modelo misto seguinte:

$$Y_{ijk} = \mu + TA_i + D_j + P_k + e_{ijk}$$

onde:

$Y_{ijk}$  é a apreciação sensorial do provador  $k$  para o hidromel com  $i$  teor alcoólico e  $j$  teor em açúcar.

$\mu$  é a média geral,

$TA_i$  é o efeito fixo do teor alcoólico ( $i=1, 2, 3$ ),

$D_j$  é o efeito fixo do teor em açúcar ( $j=1, 2$ ).

$P_k$  é o efeito aleatório do provador  $k$  ( $k=1, 2, \dots, 108$ ).

$e_{ijk}$  é o erro aleatório com média zero e variância 1.

Os efeitos da sessão e da interacção entre o teor alcoólico e o teor em açúcar não apresentaram efeitos significativo ( $P > 0,05$ ) nos parâmetros sensoriais avaliados no hidromel. Desta forma, estes efeitos foram retirados do modelo.



## Capítulo III

### *Resultados e Discussão*

## **Estudo I) Produção de hidromel às escalas laboratorial e piloto – ensaios preliminares**

### **I.1 Produção de hidromel à escala laboratorial**

A evolução das fermentações do hidromel ao longo do tempo durante a produção à escala laboratorial encontra-se apresentada na Figura 5A. Em relação à biomassa, não foi observada fase *lag*, tendo a fase exponencial uma duração de cerca de 90 horas. Após isso, observou-se a fase estacionária.

Em relação aos teores de glucose e frutose, ambos os açúcares foram metabolizados pelas leveduras durante as fases exponencial e estacionária. Os teores de glucose diminuíram de 101 para 5,13 g/L e de frutose de 125 para 11,1 g/L. Estes resultados indicam que ambos os açúcares foram quase totalmente consumidos. Adicionalmente, a taxa de consumo de glucose foi maior do que a de frutose, como observado pela inclinação das curvas, mostrando um consumo preferencial do primeiro açúcar face ao segundo.

A concentração final de etanol foi de  $99,4 \pm 0,9$  g/L. O glicerol e o ácido acético também foram produzidos ao longo da fermentação, obtendo-se no final do processo os seguintes valores:  $6,42 \pm 0,03$  e  $0,60 \pm 0,05$  g/L, respectivamente.

### **I.2 Produção de hidromel à escala piloto**

A evolução da fermentação durante a produção à escala piloto encontra-se apresentada na Figura 5B. Em termos gerais, algumas diferenças foram detectadas quando se comparam estes resultados com os obtidos anteriormente na produção à escala laboratorial. Em relação à biomassa, observou-se uma fase *lag* com uma duração de cerca de 28 horas. A fase exponencial teve uma duração total de cerca de 60 horas.

Verificou-se que às 125 horas após a inoculação, a biomassa diminuiu. Isto pôde ter sido devido a dois fenómenos: i) Dificuldades em promover a agitação desejável do meio aquando da colheita de amostras; ii) Sedimentação das células, uma vez que a cuba utilizada não tinha qualquer sistema mecânico de agitação.

Em termos de glucose e frutose, também ambos os açúcares foram metabolizados pelas leveduras. Os teores de glucose diminuíram de 121 para 5,09 g/L e de frutose de 137 para 36,4 g/L. Ao comparar estes valores finais com os obtidos no

ensaio anterior, os resultados obtidos para a glucose foram semelhantes. Em relação à frutose verificaram-se concentrações finais mais altas na produção à escala piloto. Também nestas condições foi observada uma maior taxa de consumo de glucose em relação à de frutose. A concentração final de etanol foi superior à obtida no ensaio à escala laboratorial (124 g/L). O glicerol e o ácido acético aumentaram progressivamente ao longo de fermentação, atingindo os valores finais: 6,84 e 0,94 g/L, respectivamente.

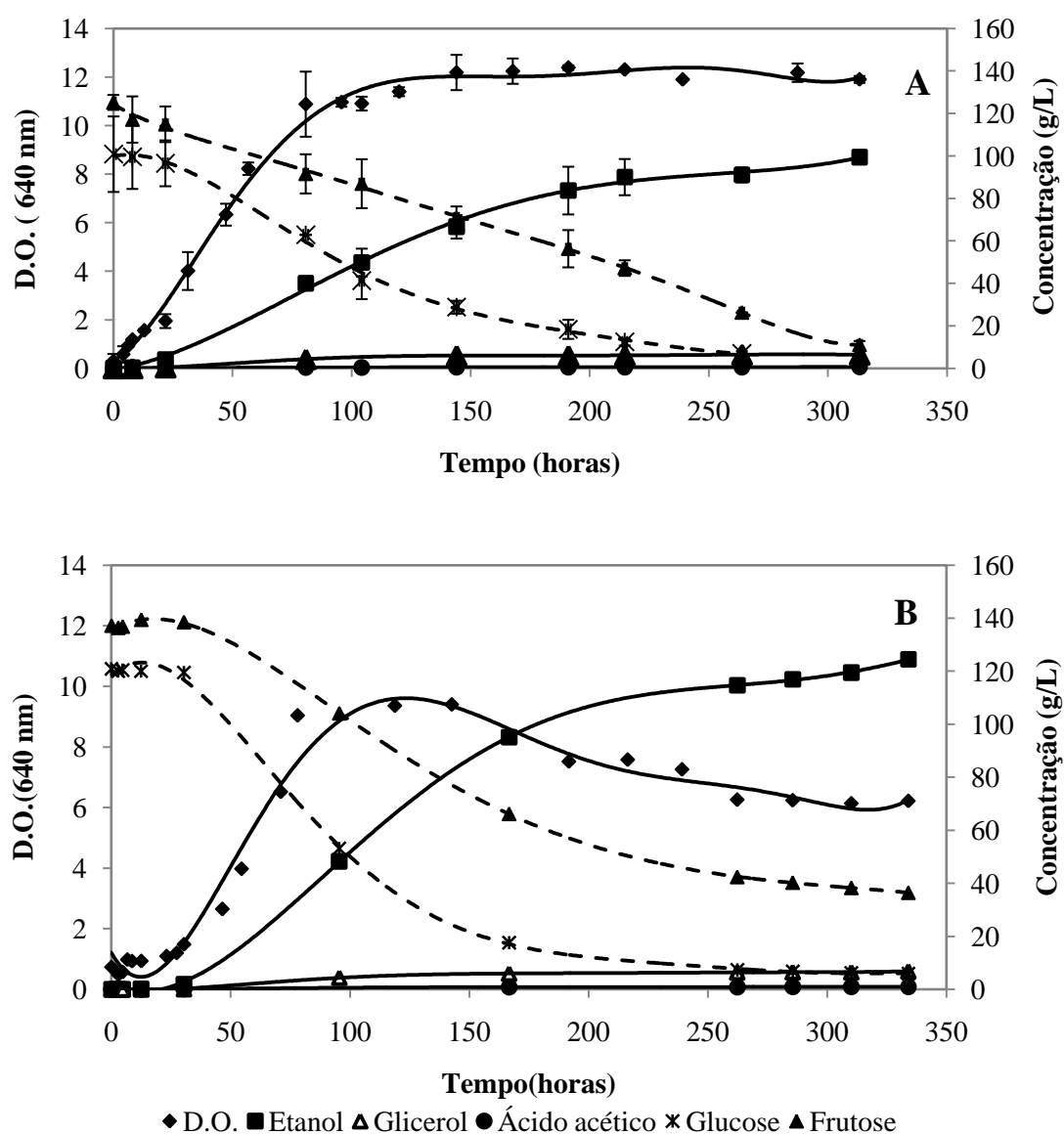


Figura 5 - Evolução das fermentações na produção de hidromel às escalas laboratorial (A) e piloto (B).

A fim de facilitar a comparação das escalas de produção, determinaram-se ainda os seguintes parâmetros: concentrações totais de açúcares (glucose+frutose)

consumidos, produções finais de etanol, concentrações finais de glicerol e ácido acético e o rendimento de etanol ( $Y_{\text{etanol/açúcares}}$ ) (Tabela 3).

Tabela 3 – Parâmetros determinados nas fermentações alcoólicas realizadas no biorreactor de 1,5 L (escala laboratorial) e em cuba de inox de 20 L (escala piloto).

Parâmetro	Biorreactor (1,5L)	Cuba inox (20L)
Tempo total da fermentação (h)	315±22	334
Açúcares consumidos (g/L)*	218±16	216
Etanol (%)	9,69±0,02	12,4
$Y_{\text{Etanol/Açúcares}}$ (%)	35,3±2,2	45,5
Glicerol (g/L)	6,36±0,09	6,84
Ácido acético (g/L)	0,56±0,02	0,94

\*Determinado como  $\Sigma(\text{Glucose} \pm \text{Frutose})$ .

Nota: os valores apresentados correspondem à média±amplitude/2

Em relação aos açúcares consumidos, os valores obtidos em ambos os ensaios foram comparáveis. Relativamente ao etanol, observou-se uma maior concentração final à escala piloto, resultando num maior rendimento (45,5 versus 35,3%). Outro aspecto importante que deve ser referido é o comportamento incomum da produção de etanol. De facto, este é um metabolito primário que se espera ser produzido ao longo da fase exponencial. No entanto, como constatado anteriormente por Pereira *et al.* (2009), a produção de etanol no hidromel pode ainda ser observada ao longo da fase estacionária. Neste trabalho este comportamento ocorreu em ambas as escalas de produção.

Tendo em conta as concentrações de glicerol indicadas na literatura para vinhos, as concentrações obtidas em ambos os ensaios para este composto estão de acordo com os referenciados. Rankine and Bridson (1971), por exemplo, referem que em vinhos australianos o intervalo da concentração de glicerol deverá situar-se entre as 1,4 e 9,9 g/L. O glicerol, de natureza não volátil, é um produto importante da fermentação alcoólica. Embora não contribua para o aroma do vinho, promove a sua “maciez” e viscosidade, aumentando a suavidade do mesmo quando produzido em maiores quantidades, melhorando a qualidade do produto final (Karasau and Özbas, 2003; Noble and Bursick, 1984). No presente trabalho obteve-se um valor de glicerol ligeiramente

superior na fermentação em cuba de inox em relação aos determinados no biorreactor. No entanto, os valores foram idênticos para ambos os ensaios.

Em relação ao ácido acético, a concentração mais elevada foi obtida na produção à escala piloto (20L), tendo sido determinada uma concentração próxima do dobro da média observada à escala laboratorial. Contudo, em ambas as escalas de produção os valores finais foram inferiores ao limite legal, o qual deve ser inferior a 18 meq/L correspondente 1,1 g/L (Regulamento (CE) N.º 1493/1999, Anexo VB-1b).

## **Estudo II) Análise do processo de fermentação em relação aos factores, temperatura e concentração de nutrientes adicionados ao mosto, para duas estirpes comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* através de um desenho experimental**

### **II.1 Desenho experimental**

Para se alcançar uma fermentação bem sucedida é necessário ter em atenção diversos factores que a podem afectar. Tal como já foi referido anteriormente, na produção de hidromel podem existir dificuldades que acarretam, por exemplo, “amuos” na fermentação. Estes problemas podem resultar do facto do mel ser pobre em determinados compostos, os quais podem ser essenciais às leveduras. Dessa forma é de extrema importância determinar a gama de concentrações de sais a adicionar ao mosto que permita o desenvolvimento de uma fermentação adequada. Além disso, como a produção de hidromel surge como uma possível alternativa aos produtores de mel da região de Trás-os-Montes, e tendo em conta que nesta região a amplitude de temperaturas é elevada, esta variável (temperatura) poderá também ter um papel importante na fermentação.

Tendo em conta estes factores, pretendeu-se nesta parte do trabalho investigar o efeito dessas duas variáveis independentes (concentração de nutrientes e temperatura) a três níveis (-1,0,1) sobre as variáveis dependentes: etanol, glicerol e ácido acético. Adicionalmente, também se avaliou o seu efeito sobre a concentração residual de açúcares, designadamente da glucose e frutose.

Neste trabalho utilizaram-se duas leveduras enológicas, efectuando-se estudos idênticos para cada uma das leveduras. Para tal, foram realizados 12 ensaios

experimentais com diferentes combinações dos dois factores (Tabela 2) para cada uma das leveduras.

Devido ao número significativo de fermentações realizado, para simplificar e facilitar a interpretação dos resultados optou-se por apresentar o desenvolvimento das fermentações só para cinco situações concretas, designadamente:

A) T=20°C (nível -1) + Concentração de sais = 120 g/hL (nível 1)	} Condições extremas
B) T=20°C (nível -1) + Concentração de sais = 60 g/hL (nível -1)	
C) T=30°C (nível 1) + Concentração de sais = 120 g/hL (nível 1)	
D) T=30°C (nível 1) + Concentração de sais = 60 g/hL (nível -1)	
E) T=25°C (nível 0) + Concentração de sais = 90 g/hL (nível 0)	} Condição central

### ***II.1.1 Evolução das várias fermentações realizadas ao longo do tempo para as duas leveduras***

Os resultados obtidos para a estirpe *Saccharomyces cerevisiae* Fermol® Reims Champagne (Pascal Biotech®) encontram-se representados nas Figuras 6A a 6E, consoante a temperatura e concentração de nutrientes.

Em relação à biomassa, verificou-se que, em termos gerais, as maiores concentrações foram obtidas nos ensaios 6A, 6C e 6E, obtendo-se idênticas taxas máximas específicas de crescimento. Estas experiências decorreram às temperaturas de 30°C (A e C) e 25°C (E) na gama de concentrações de sais entre 60 e 120 g/hL. Pelo contrário, os ensaios B e D decorreram a uma temperatura de 20°C, originando concentrações de biomassa ligeiramente inferiores às dos ensaios anteriores e tendo para o ensaio B sido observada uma menor taxa máxima específica de crescimento. Em termos de duração da fase exponencial, verificou-se que na maioria das situações, a fase estacionária teve início após aproximadamente 70 horas, com excepção dos ensaios C e D que iniciaram por volta das 50 horas.

Relativamente ao etanol, as concentrações finais determinadas foram da mesma ordem de grandeza em todos os ensaios, sendo iguais a  $91,4 \pm 0,06$ ,  $107 \pm 0,02$ ,  $113 \pm 0,03$ ,  $115 \pm 0,22$  e  $119 \pm 0,43$  g/L para os casos A, B, C, D e E, respectivamente. Verificou-se, portanto, que a concentração mais baixa foi obtida no ensaio A, correspondente a uma temperatura de 30°C e uma concentração de sais de 60 g/hL.

Em relação aos açúcares, observou-se que em todos os ensaios, tanto a frutose como a glucose foram consumidas ao longo das fermentações. Geralmente, a taxa de consumo de glucose foi ligeiramente superior (como por exemplo, no ensaio 6C) ou idêntica (ensaio 6A) à de frutose.

O glicerol e o ácido acético também foram produzidos ao longo da fermentação. Em termos gerais, a sua produção não diferiu significativamente nas diferentes situações estudadas.

O desenvolvimento das fermentações realizadas com a levedura ICV<sup>®</sup>D47 encontram-se representadas nas Figuras 7A a 7E. Verificou-se que maiores concentrações de biomassa foram obtidas para o ensaio A (temperatura a 30°C e concentração de sais de 60g/hL). Visualizando os gráficos, foi novamente no ensaio B que se verificou a menor taxa máxima específica de crescimento. De forma idêntica à levedura anterior, a fase estacionária teve início entre as 70 e as 80 horas para a maioria dos ensaios, observando-se um comportamento diferente para o ensaio D. Neste, a fase estacionária iniciou aproximadamente às 50 horas.

As concentrações finais de etanol foram iguais a  $88,3 \pm 0,37$ ,  $106,8 \pm 1,17$ ,  $115 \pm 0,08$ ,  $113 \pm 0,04$  e  $124,7 \pm 0,10$  g/L para os casos A, B, C, D e E, respectivamente, observando-se uma amplitude maior face aos da levedura anterior.

Em relação aos teores de açúcar, a glucose e a frutose foram ambas consumidas. Pela análise da Figura 7D, observa-se que neste ensaio a taxa de consumo de glucose foi superior à de frutose. Pelo contrário, na Figuras 7 A, B, C e E, constata-se que as taxas de consumo de glucose e frutose foram semelhantes, não se detectando o consumo preferencial de glucose. O glicerol e o ácido acético também foram produzidos ao longo da fermentação, não tendo a sua produção diferido significativamente nas diferentes situações estudadas.

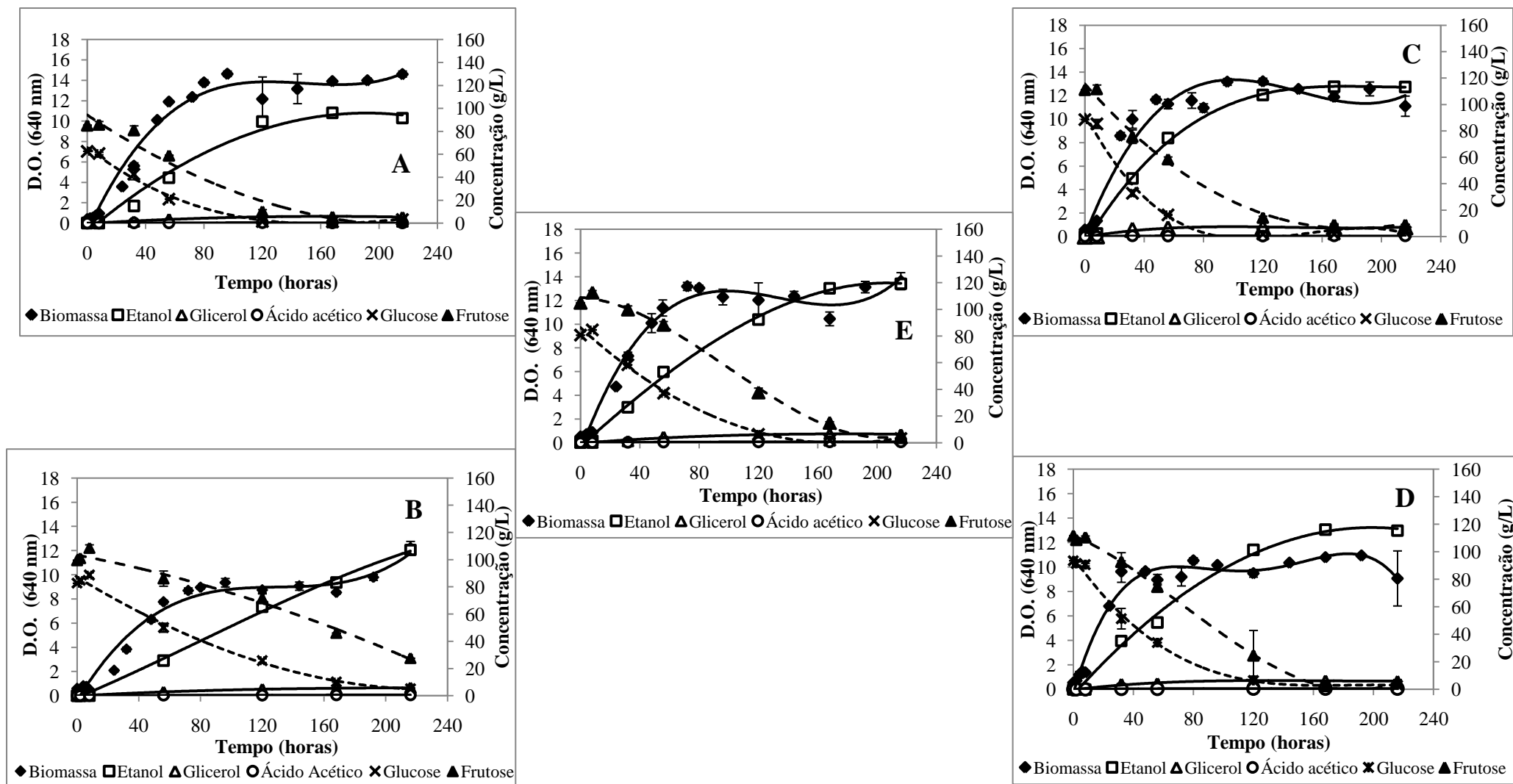


Figura 6 – Fermentações a diferentes temperaturas e concentrações de sais para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Fermol® Reims Champagne (Pascal Biotech®) (Condições A, B, C, D e E).



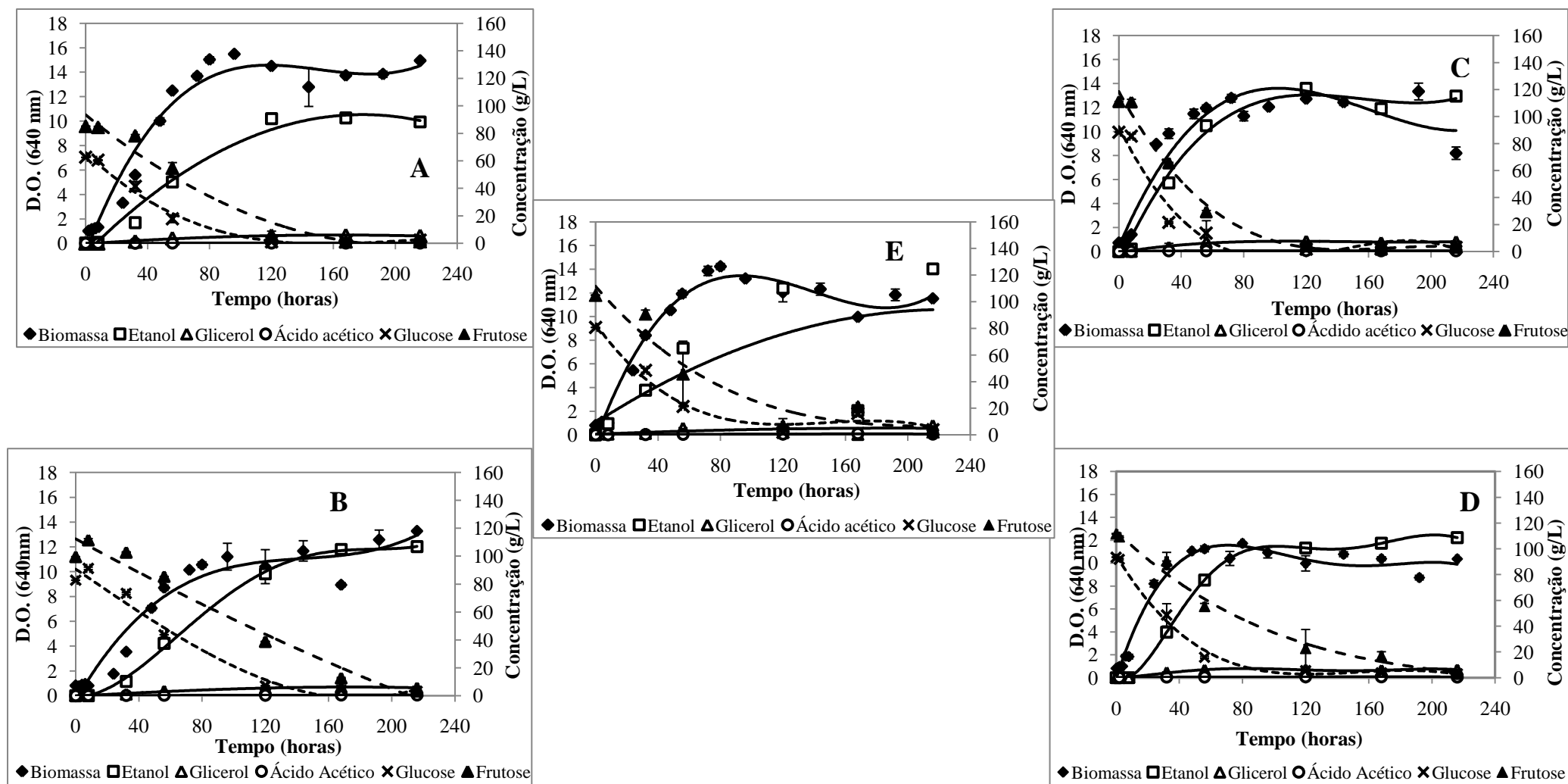


Figura 7 – Fermentações a diferentes temperaturas e concentrações de sais para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ICV®D47 (Condições A, B, C, D e E).

Tendo em conta os resultados obtidos nos 12 ensaios realizados para cada uma das estirpes (Tabelas 4 e 5) constatou-se que para a estirpe *Saccharomyces cerevisiae* Fermol<sup>®</sup> Reims Champagne (Pascal Biotech<sup>®</sup>) a produção de etanol variou entre 91,4±0,06 (correspondente ao ensaio a 20°C e 120g/hL), resultando no menor rendimento (36,25%), e 123,6± 0,10 g/L (correspondente ao ensaio a 25°C e 90 g/hL), resultando num maior rendimento (49,05%). Comparativamente à segunda estirpe, *Saccharomyces cerevisiae* ICV<sup>®</sup> D47, a gama de valores obtida em relação à primeira foi maior. Com a segunda estirpe obteve-se a menor concentração de etanol (88,3± 0,37 g/L), resultando no menor rendimento (35,02%), mas também a maior (125,9± 0,10 g/L), resultando no maior rendimento (49,96%).

No caso da produção do ácido acético, este atingiu o valor mínimo de 0,12±0,06 g/L e o valor máximo de 0,78±0,003 g/L durante as fermentações com a primeira estirpe. Para a segunda estirpe os valores variaram menos, entre 0,19±0,03 e 0,63±0,05 g/L. No entanto, realce-se o facto de os valores continuarem a ser inferiores ao limite legal (inferior a 18 meq/L que corresponde a cerca de 1,1 g/L) (Regulamento (CE) N ° 1493/1999, Anexo VB-1b).

O glicerol também foi produzido ao longo das fermentações, atingindo valores que variaram entre 5,40±0,04 e 7,04±0,05 g/L para a primeira levedura. No caso da segunda levedura os teores de glicerol obtidos oscilaram entre 5,45±0,18 e 7,51±0,13 g/L, gama idêntica à obtida para a primeira levedura. Em ambas as situações, os valores obtidos estão de acordo com os valores publicados na literatura para vinhos. Rankine e Bridson (1971) referem que em vinhos australianos o intervalo da concentração de glicerol deverá situar-se entre 1,4 e 9,9 g/L.

Em relação aos açúcares, e como anteriormente referido, tanto a glucose como a frutose foram metabolizadas pelas leveduras. Os valores iniciais de açúcar foram de aproximadamente 252 g/L, sendo a glucose consumida durante a fermentação até valores finais de 2,55±0,50 a 5,11±0,11 g/L para a primeira levedura e de 2,30±0,17 a 4,73±0,07g/L para a segunda levedura, sugerindo um comportamento idêntico para ambas as estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*. No caso da frutose, esta também foi metabolizada durante a fermentação até valores finais de 1,51±0,31 a 27,61±0,16 g/L para a primeira levedura e de 1,35±0,07 a 3,24±0,04 g/L para a segunda levedura. Estes resultados indicam uma diferença acentuada na metabolização da frutose por parte das duas estirpes, concluindo-se que a segunda levedura utilizou os dois açúcares com maior eficiência do que a primeira. Estes resultados vêm de encontro aos reportados em

estudos anteriores de fermentação do vinho (Fleet, 1998; Berthels *et al.*, 2004), os quais indicam que embora a glucose e a frutose sejam consumidas ao longo do processo de fermentação, as estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* têm preferência pela glucose, sendo esta consumida mais rapidamente, resultando numa possível preponderância de frutose no final da fermentação.

Tabela 4 – Concentrações finais (g/L) de glucose, frutose, etanol, ácido acético e glicerol, para a estirpe *Saccharomyces cerevisiae* Fermol® Reims Champagne (Pascal Biotech®), determinadas nos diferentes ensaios do desenho experimental.

Ensaio	Glucose	Frutose	Etanol	Ácido acético	Glicerol	Y <sub>etanol/açúcar</sub>
<i>Caso</i>						
1	2,88±0,23	2,27±0,01	114,8± 0,03	0,58±0,05	5,42±0,001	45,55%
2 <b>D</b>	3,04±0,06	5,40±1,74	115,3± 0,22	0,57±0,02	6,03±0,35	45,75%
3	2,59±0,22	7,85±1,41	110,6± 0,08	0,48±0,02	5,71±0,01	43,88%
4 <b>B</b>	5,11±0,11	27,61±0,16	107,1± 0,02	0,53±0,004	5,87±0,05	42,49%
5 <b>C</b>	3,38±0,13	9,13±0,0008	113,3± 0,03	0,45±0,40	7,04±0,05	44,95%
6 <b>A</b>	3,05±0,13	1,51±0,31	91,4± 0,06	0,12±0,06	5,40±0,04	36,25%
7 <b>E</b>	3,08±0,52	4,24±0,18	119,2± 0,43	0,58±0,04	6,35±0,14	47,31%
8	3,29±0,29	4,51±0,39	122,8± 0,19	0,55±0,03	6,68±0,02	48,34%
9	4,32±0,03	5,83±0,07	121,9± 0,005	0,78±0,003	6,89±0,01	47,96%
10	3,61±0,30	4,43±0,11	114,8± 0,20	0,53±0,03	6,21±0,07	45,55%
11	3,08±0,40	4,24±0,08	119,2± 0,05	0,58±0,05	6,35±0,10	47,30%
12	2,55±0,50	4,06±0,07	123,6± 0,10	0,62±0,02	6,50±0,08	49,05%

Tabela 5 – Concentrações finais (g/L) de glucose, frutose, etanol, ácido acético e glicerol, para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ICV<sup>®</sup> D47, determinadas nos diferentes ensaios do desenho experimental.

Ensaio	Glucose	Frutose	Etanol	Ácido acético	Glicerol	Y <sub>etanol/açúcar</sub>
<i>Caso</i>						
1	3,10±0,18	2,65±0,02	114,9± 0,15	0,54±0,04	6,08±0,12	45,59%
2 <b>D</b>	3,00±0,13	2,63±0,19	108,7± 0,04	0,51±0,03	6,13±0,03	43,14%
3	2,96±0,01	1,92±0,008	113,4± 0,02	0,54±0,002	6,16±0,03	44,99%
4 <b>B</b>	3,11±0,32	3,20±0,48	106,8± 1,17	0,48±0,03	5,69±0,63	42,37%
5 <b>C</b>	3,02±0,09	3,24±0,04	115,1± 0,08	0,58±0,02	7,47±0,21	45,67%
6 <b>A</b>	2,30±0,17	1,35±0,07	88,3± 0,37	0,19±0,03	5,45±0,18	35,02%
7 <b>E</b>	3,93±0,07	2,51±0,04	124,7± 0,13	0,59±0,006	7,14±0,01	49,48%
8	3,89±0,07	2,16±0,005	122,4± 0,03	0,59±0,008	7,03±0,10	48,18%
9	4,73±0,07	2,87±0,05	122,6± 0,14	0,63±0,05	7,51±0,13	48,24%
10	3,38±0,11	2,47±0,05	123,4± 0,20	0,60±0,11	7,13±0,03	48,97%
11	3,93±0,12	2,51±0,10	124,7± 0,10	0,59±0,05	7,14±0,12	49,48%
12	4,01±0,07	2,56±0,07	125,9± 0,10	0,59±0,05	7,15±0,02	49,96%

### II.1.2 Tratamento estatístico dos resultados

Tal como referido anteriormente os dados experimentais foram analisados pelo método RSM. Dessa forma pretendeu-se desenvolver modelos empíricos que descrevessem as relações existentes entre as variáveis operacionais (temperatura e concentração de nutrientes) e as experimentais (dependentes), designadamente, as concentrações finais de etanol, ácido acético, glicerol, glucose e frutose. Na Tabela 6 encontram-se descritos os coeficientes de regressão e os respectivos significados estatísticos para os modelos calculados, bem como os parâmetros,  $R^2$  e F, que permitem avaliar o ajuste em termos gerais. Desta forma testa-se a hipótese das diferenças encontradas entre os dados experimentais e os calculados pelos modelos não serem significativas.

Todos os modelos (etanol, ácido acético, glicerol, glucose, frutose) deram significativos ( $p < 0,05$ ) para ambas as leveduras. Os valores de F variaram entre 3,99

(etanol) e 16,73 (glucose) para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Fermol<sup>®</sup> Reims Champagne (Pascal Biotech<sup>®</sup>), e 7,79 (ácido acético) e 24,32 (glicerol) para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ICV<sup>®</sup> D47. Os valores de  $R^2$  dos modelos variaram entre 0,646 (glucose) e 0,913 (ácido acético) para a primeira levedura e entre 0,771 (frutose) e 0,946 (glicerol) para a segunda levedura. Contudo, constatou-se que para esta última levedura o ajuste do modelo não foi tão adequado como o da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Fermol<sup>®</sup> Reims Champagne (Pascal Biotech<sup>®</sup>). De facto, o “lack-of-fit” (Tabela 7) foi significativo ( $p < 0,05$ ) nos cinco modelos, ao contrário do observado com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Fermol<sup>®</sup> Reims Champagne (Pascal Biotech<sup>®</sup>) para o caso do etanol, ácido acético, e glicerol ( $p > 0,05$ ). Isto significa que os ajustes determinados para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ICV<sup>®</sup> D47, em relação aos modelos matemáticos desenvolvidos, não foram tão adequados como os determinados para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Fermol<sup>®</sup> Reims Champagne (Pascal Biotech<sup>®</sup>) para os três parâmetros anteriormente referidos.

Em relação às fermentações conduzidas pela estirpe *Saccharomyces cerevisiae* Fermol<sup>®</sup> Reims Champagne (Pascal Biotech<sup>®</sup>) (Tabela 6), observou-se que a adição de sais só originou pequenos efeitos nas variáveis estudadas, tal como pôde ser constatado pelos baixos valores absolutos dos correspondentes coeficientes de regressão ( $B_1$ ). Observou-se uma excepção relativamente à frutose, uma vez que a sua quantidade final diminui significativamente à medida que se aumenta a concentração de sais ( $p < 0,05$ ). Em relação ao termo quadrático relativo à concentração de sal enovit ( $B_{11}$ ), o mesmo foi significativo para a produção de etanol, ácido acético e glicerol, demonstrando, contudo, que o aumento da concentração de nutrientes influencia negativamente o teor destes produtos ao longo da fermentação alcoólica. A temperatura causou um efeito positivo significativo ( $p < 0,05$ ) na produção de ácido acético e glicerol, tal como demonstrado pelos valores dos coeficientes  $B_2$  (linear) (ambos os parâmetros) e  $B_{22}$  (quadrático) (glicerol). Este último parâmetro foi também significativo para a glucose. Quanto ao termo interactivo referente à concentração de Sais Enovit e a temperatura, verificou-se que este foi significativo para o ácido acético, glicerol e frutose.

Durante as fermentações da estirpe *Saccharomyces cerevisiae* ICV<sup>®</sup> D47 (Tabela 6), observou-se que a concentração de sais Enovit teve um efeito linear significativo sobre a produção de ácido acético ( $p < 0,05$ ) e efeitos quadráticos muito significativos sob o teor de etanol, glicerol e de consumo de glucose ( $p < 0,01$ ). Em relação à temperatura, esta teve efeitos lineares significativos na produção de etanol ( $p < 0,05$ ),

glicerol ( $p < 0,01$ ) e na metabolização da glucose e frutose (ambos com  $p < 0,05$ ). Analisando os resultados do termo quadrático relativo à temperatura, verificou-se que o mesmo não foi significativo para nenhum dos parâmetros estudados. Quanto ao termo interactivo referente à concentração de Sais Enovit e a temperatura, verificou-se ser significativo para o etanol, ácido acético, glicerol e frutose.

Tabela 6 – Coeficientes das regressões, nível de significância (p),  $R^2$  e valores F dos modelos para prever o etanol ( $y_1$ ,  $y'_1$ ), o ácido acético ( $y_2$ ,  $y'_2$ ), o glicerol ( $y_3$ ,  $y'_3$ ), a glucose ( $y_4$ ,  $y'_4$ ), e a frutose ( $y_5$ ,  $y'_5$ ), para as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* Fermol® Reims Champagne (Pascal Biotech®) e *Saccharomyces cerevisiae* ICV® D47.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Fermol® Reims Champagne (Pascal Biotech®)										
Ensaio	Etanol $y_1$	p ( $y_1$ )	Ácido Acético $y_2$	p ( $y_2$ )	Glicerol $y_3$	p ( $y_3$ )	Glucose $y_4$	p ( $y_4$ )	Frutose $y_5$	p ( $y_5$ )
B <sub>0</sub>	12,1214	0,000	0,603276	0,000	6,3723	0,000	2,9676	0,000	3,5390	0,017
B <sub>1</sub>	-0,2233	0,382	-0,005	0,856	0,04117	0,657	-0,236	0,360	-4,6590	0,004
B <sub>11</sub>	-1,1348	0,015	-0,102966	0,034	-0,76271	0,001	-0,2022	0,587	3,2120	0,090
B <sub>2</sub>	0,4867	0,081	0,166667	0,000	0,33717	0,007	-0,1167	0,643	-3,3210	0,087
B <sub>22</sub>	-0,1648	0,654	0,031034	0,453	0,45829	0,010	0,8688	0,044	2,2100	0,082
B <sub>12</sub>	0,3400	0,284	0,1695	0,001	0,37125	0,011	0,6012	0,081	7,4570	0,001
R <sup>2</sup>	0,741		0,913		0,899		0,646		0,902	
F	3,99	0,049	14,67	0,001	12,41	0,002	16,73	0,001	4,70	0,033
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ICV® D47										
Ensaio	Etanol $y'_1$	p ( $y'_1$ )	Ácido Acético $y'_2$	p ( $y'_2$ )	Glicerol $y'_3$	p ( $y'_3$ )	Glucose $y'_4$	p ( $y'_4$ )	Frutose $y'_5$	p ( $y'_5$ )
B <sub>0</sub>	12,5886	0,000	0,45640	0,189	7,1523	0,000	4,0267	0,000	2,4818	0,000
B <sub>1</sub>	-0,1750	0,343	-0,78930	0,038	0,1778	0,073	-0,1082	0,306	-0,0860	0,523
B <sub>11</sub>	-1,4102	0,001	0,43490	0,371	-1,0661	0,000	-1,1789	0,000	-0,0809	0,681
B <sub>2</sub>	0,4817	0,027	-0,67680	0,065	0,4882	0,001	0,2405	0,044	0,3372	0,034
B <sub>22</sub>	-0,5802	0,056	0,50440	0,304	0,1099	0,406	0,1061	0,486	0,1526	0,445
B <sub>12</sub>	0,6275	0,021	1,21750	0,015	0,3930	0,007	0,2068	0,128	0,6155	0,006
R <sup>2</sup>	0,911		0,848		0,946		0,923		0,771	
F	14,29	0,001	7,79	0,009	24,32	0,000	12,90	0,002	10,28	0,004

B<sub>0</sub>= constante; B<sub>1</sub>= Sal Enovit (termo linear); B<sub>2</sub>= Temperatura (termo linear); B<sub>11</sub>= Sal Enovit<sup>2</sup> (termo quadrático); B<sub>22</sub>= Temperatura<sup>2</sup> (termo quadrático); B<sub>12</sub>= Sal Enovit\*Temperatura (termo interativo);

Tabela 7 – ANOVA para o modelo quadrático da RSM.

Saccharomyces cerevisiae Fermol® Reims Champagne (Pascal Biotech®)						Saccharomyces cerevisiae ICV® D47					
Etanol											
Fonte	DF	Sum of squares (SS)	Mean square	Valor- F	Valor-p	Fonte	DF	Sum of squares (SS)	Mean square	Valor- F	Valor-p
Regressão	5	6,8849	1,3770	3,99	0,049	Regressão	5		2,53727	14,29	0,001
Linear	2	1,7189	0,8595	2,49	0,152	Linear	2	12,6864	0,78376	4,42	0,057
Quadrática	2	4,7047	2,3524	6,82	0,023	Quadrática	2	1,5675	4,77692	26,91	0,001
Interacção	1	0,4612	0,4612	1,34	0,285	Interacção	1	9,5538	1,56500	8,82	0,021
Erro Residual	7	2,4133	0,3448			Erro Residual	7	1,5650	0,17751		
Lack-of-fit	3	1,8724	0,6241	4,62	0,087	Lack-of-fit	3	1,2426	0,39975	36,93	0,002
Erro puro	4	0,5409	0,1352			Erro puro	4	1,1993	0,01082		
Total	12	9,2983				Total	12	0,0433			
								13,9289			
Ácido acético											
Fonte	D F	Sum of squares (SS)	Mean square	Valor- F	Valor-p	Fonte	DF	Sum of squares (SS)	Mean square	Valor- F	Valor-p
Regressão	5	0,311397	0,062279	14,67	0,001	Regressão	5	0,128798	0,025760	7,79	0,009
Linear	2	0,166719	0,083359	19,64	0,001	Linear	2	0,042210	0,021105	6,38	0,026
Quadrática	2	0,029519	0,014760	3,48	0,089	Quadrática	2	0,054582	0,027291	8,25	0,014
Interacção	1	0,115158	0,115158	27,13	0,001	Interacção	1	0,032005	0,032005	9,67	0,017
Erro Residual	7	0,029711	0,004244			Erro Residual	7	0,023158	0,003308		
Lack-of-fit	3	0,024640	0,008213	6,48	0,051	Lack-of-fit	3	0,023058	0,007686	305,00	0,000
Erro puro	4	0,005071	0,001268			Erro puro	4	0,000101	0,000025		
Total	12	0,341108				Total	12	0,151956			
Glicerol											
Fonte	DF	Sum of squares (SS)	Mean square	Valor- F	Valor-p	Fonte	DF	Sum of squares (SS)	Mean square	Valor- F	Valor-p
Regressão	5	2,94210	0,58842	12,41	0,002	Regressão	5	5,57922	1,11584	24,32	0,000
Linear	2	0,69208	0,34604	7,30	0,019	Linear	2	1,60196	0,80098	17,46	0,002
Quadrática	2	1,69812	0,84906	17,91	0,002	Quadrática	2	3,35879	1,67940	36,60	0,000
Interacção	1	0,55190	0,55190	11,64	0,011	Interacção	1	0,61846	0,61846	13,48	0,008
Erro Residual	7	0,33184	0,04741			Erro Residual	7	0,32118	0,04588		
Lack-of-fit	3	0,27182	0,09061	6,04	0,058	Lack-of-fit	3	0,32071	0,10690	920,46	0,000
Erro puro	4	0,06002	0,01501			Erro puro	4	0,00046	0,00012		
Total	12	3,27393				Total	12	5,90040			



Saccharomyces cerevisiae Fermol® Reims Champagne (Pascal Biotech®)						Saccharomyces cerevisiae ICV® D47					
Glucose											
Fonte	DF	Sum of squares (SS)	Mean square	Valor- F	Valor-p	Fonte	DF	Sum of squares (SS)	Mean square	Valor- F	Valor-p
Regressão	5	4,80805	0,96161	16,73	0,001	Regressão	5		95,444	12,90	0,002
Linear	2	0,41724	0,20862	3,63	0,083	Linear	2	477,220	79,786	10,78	0,007
Quadrática	2	4,21999	2,10999	36,72	0,000	Quadrática	2	159,571	47,609	6,43	0,026
Interacção	1	0,17082	0,17082	2,97	0,128	Interacção	1	95,219	222,430	30,06	0,001
Erro Residual	7	0,40226	0,05747			Erro Residual	7	222,430	51,795	7,399	
		0,38774					7	51,700			
Lack-of-fit	3	0,01452	0,12925	35,62	0,002	Lack-of-fit	3	0,095	17,233	723,51	0,000
Erro puro	4	5,21031	0,00363			Erro puro	4	529,015	0,024		
Total	12					Total	12				
Frutose											
Fonte	DF	Sum of squares (SS)	Mean square	Valor- F	Valor-p	Fonte	DF	Sum of squares (SS)	Mean square	Valor- F	Valor-p
Regressão	5		0,46175	4,70	0,033	Regressão	5		109,848	10,28	0,004
Linear	2	2,30877	0,36348	3,70	0,080	Linear	2	549,242	88,171	8,25	0,014
Quadrática	2	0,72696	0,03304	0,34	0,725	Quadrática	2	176,343	56,397	5,28	0,040
Interacção	1	0,06608	1,51573	15,44	0,006	Interacção	1	112,794	260,104	24,34	0,002
Erro Residual	7	1,51573	0,09815			Erro Residual	7	260,104	74,817		
		0,68705					7	73,193	10,688		
Lack-of-fit	3	0,68176	0,22725	171,96	0,000	Lack-of-fit	3	1,624	24,398	60,08	0,001
Erro puro	4	0,00529	0,00132			Erro puro	4	1,624	24,398	60,08	0,001
		2,99581					4	624,059	0,406		
Total	12					Total	12				

Mean square = SS/DF

Os efeitos da temperatura e concentração de sais sobre as variáveis dependentes analisadas para as duas leveduras testadas, encontram-se ilustrados nos gráficos de contorno (“*Contour Plot*”), representados nas Figuras 8 a 12.

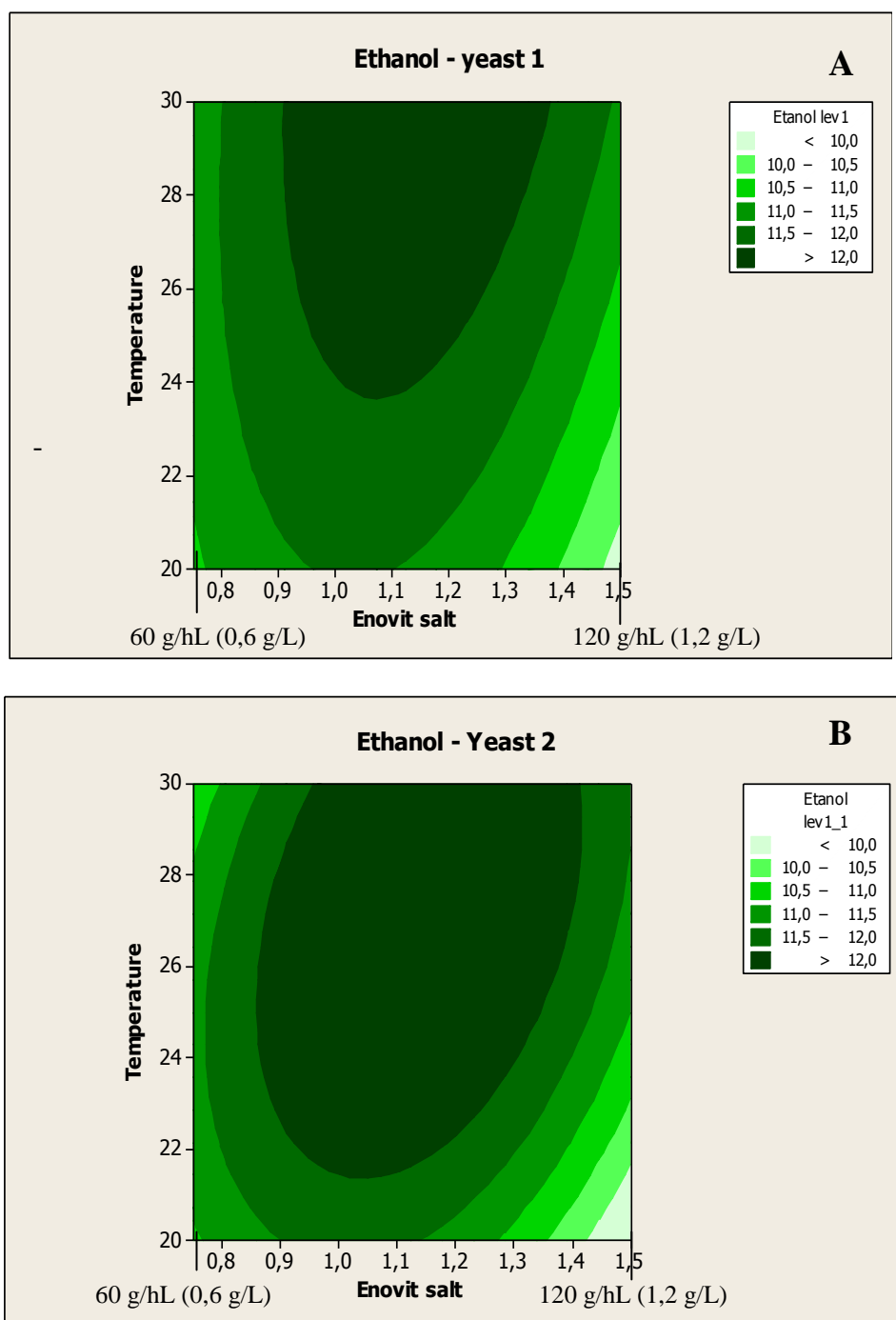


Figura 8 – Representação da interacção entre os diversos níveis de temperatura e da massa de nutrientes (sais Enovit) por 1,25 L, na produção de etanol para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Fermol® Reims Champagne (Pascal Biotech®) (A) e *Saccharomyces cerevisiae* ICV® D47 (B).

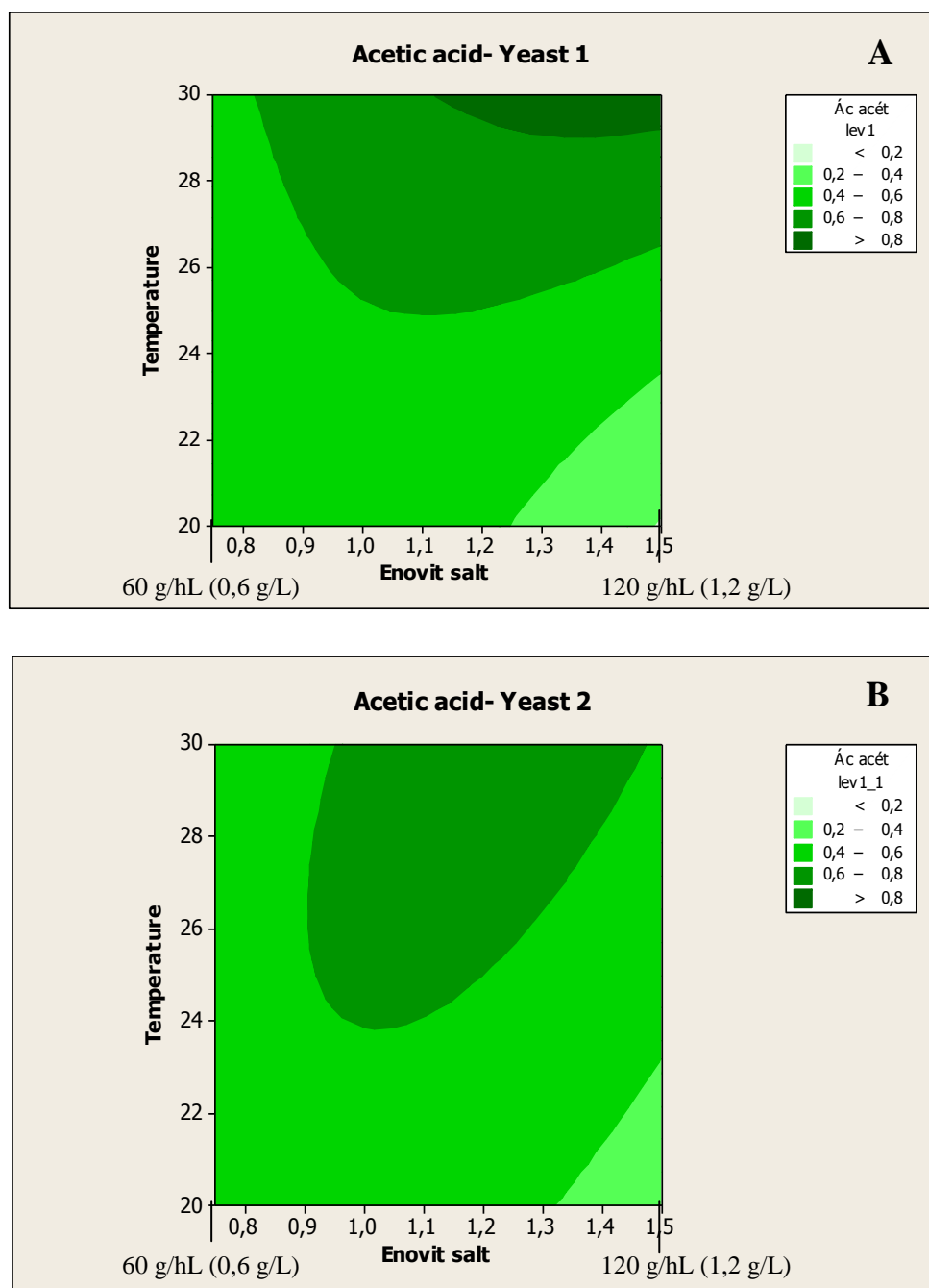


Figura 9 – Representação da interação entre os diversos níveis de temperatura e da massa de nutrientes (sais Enovit) por 1,25 L, na produção de ácido acético para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Fermol<sup>®</sup> Reims Champagne (Pascal Biotech<sup>®</sup>) (A) e *Saccharomyces cerevisiae* ICV<sup>®</sup> D47 (B).

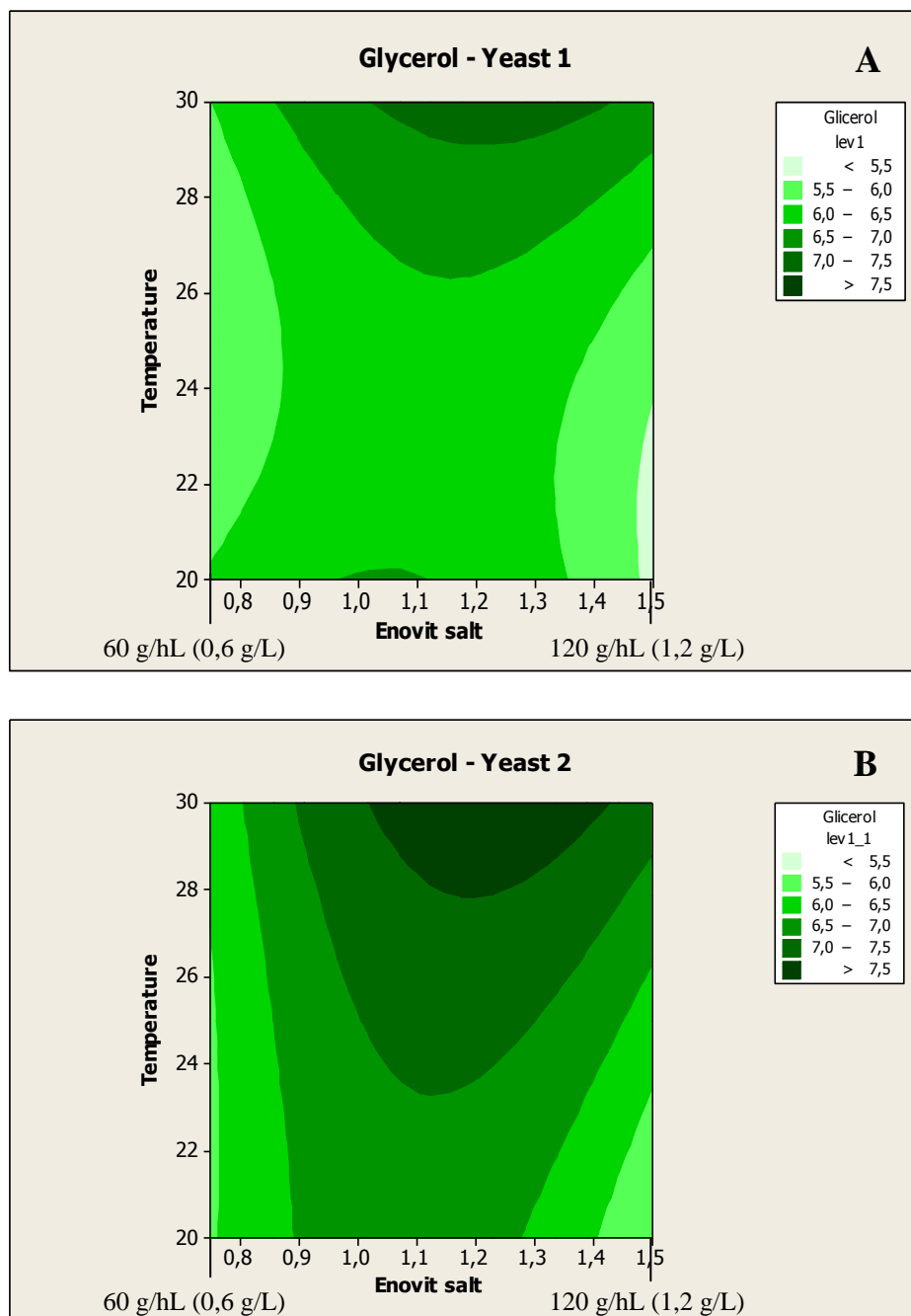


Figura 10 – Representação da interacção entre os diversos níveis de temperatura e da massa de nutrientes (sais Enovit) por 1,25 L, na produção de glicerol para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Fermol® Reims Champagne (Pascal Biotech®) (A) e *Saccharomyces cerevisiae* ICV® D47 (B).

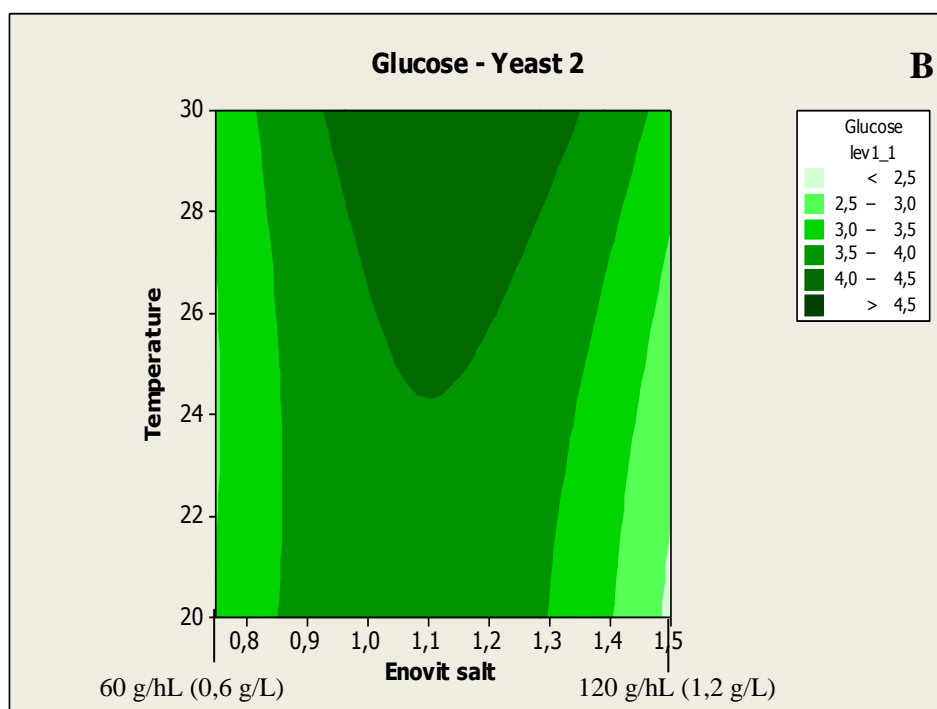
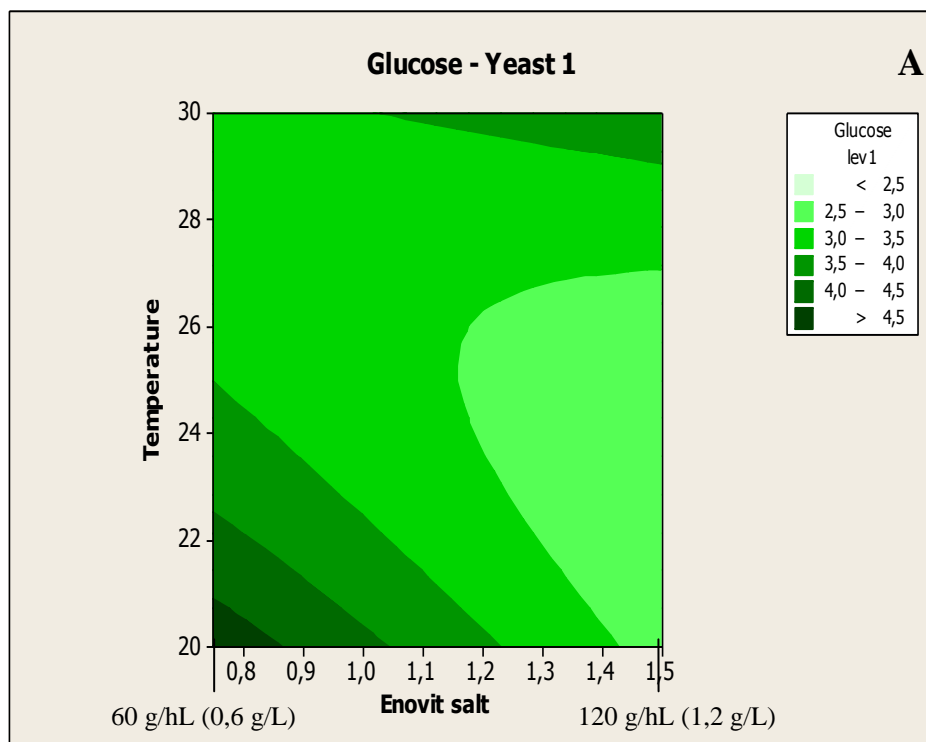


Figura 11 – Representação da interacção entre os diversos níveis de temperatura e da massa de nutrientes (sais Enovit) por 1,25 L, na concentração final de glucose para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Fermol<sup>®</sup> Reims Champagne (Pascal Biotech<sup>®</sup>) (A) e *Saccharomyces cerevisiae* ICV<sup>®</sup> D47 (B).

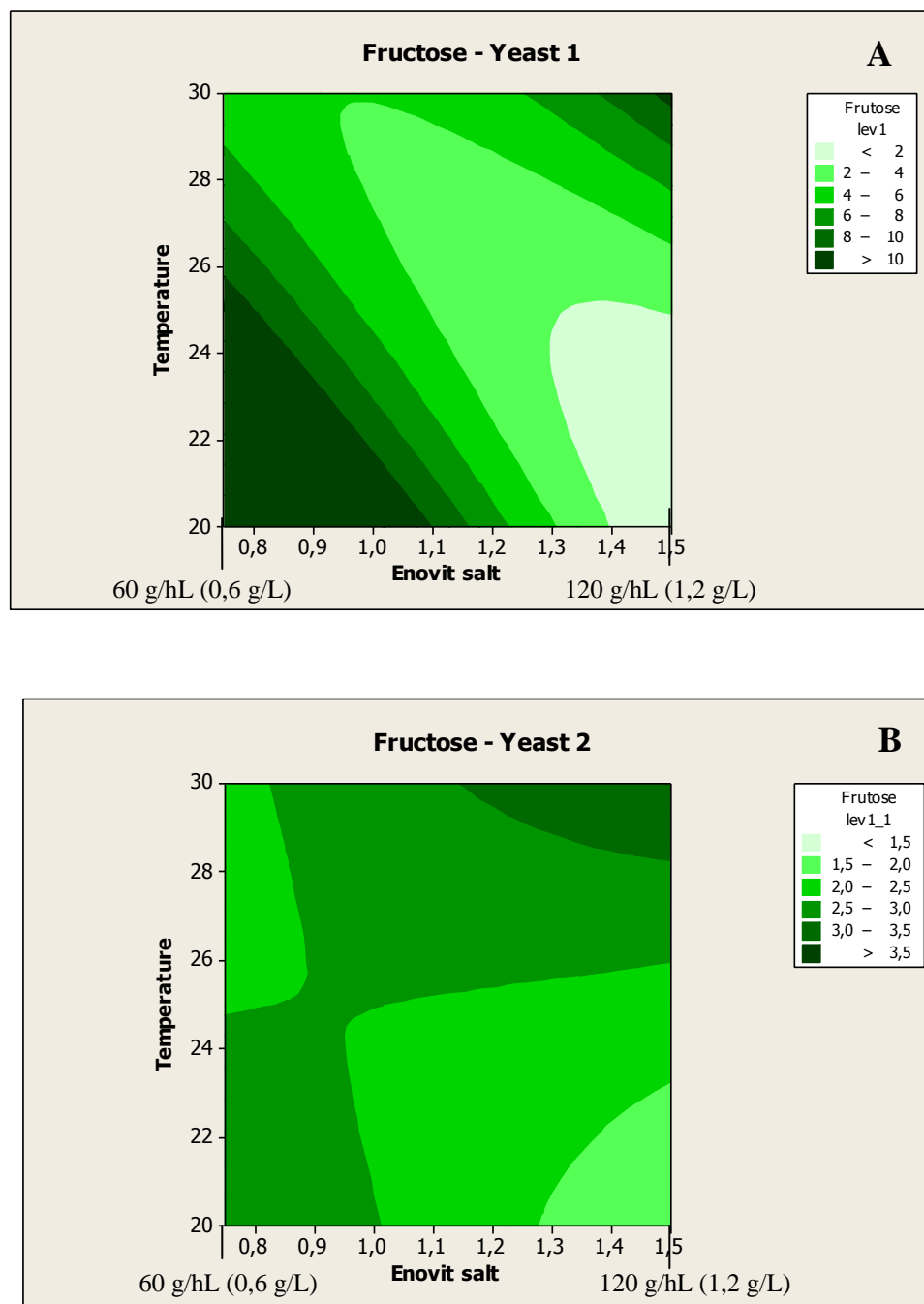


Figura 12 – Representação da interacção entre os diversos níveis de temperatura e da massa de nutrientes (sais Enovit) por 1,25 L, na concentração final de frutose para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Fermol<sup>®</sup> Reims Champagne (Pascal Biotech<sup>®</sup>) (A) e *Saccharomyces cerevisiae* ICV<sup>®</sup> D47 (B).

Em relação ao etanol e tal como previsto pelos baixos valores absolutos dos coeficientes de regressão determinados pelo modelo anterior, as gamas de temperaturas e de concentração de sais testadas pouco influenciaram a produção de etanol (Figura 8), uma vez que esta varia previsivelmente entre 10 e 12,5%, na maioria das situações. Este

comportamento foi semelhante para as duas leveduras, parecendo, contudo, que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ICV<sup>®</sup> D47 pudesse originar um maior teor de etanol numa maior gama de temperaturas (> 22°C) e de concentração de sais (0,68 a 1,04 g/L). No entanto, tal como foi referido anteriormente, o ajuste obtido para esta levedura não foi tão adequado como o da anterior, devendo essa diferença na produção de etanol ser analisada com alguma reserva.

Relativamente ao ácido acético verificou-se que temperaturas acima dos 25°C e concentrações de nutrientes entre 0,68 e 1,2 g/L, para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Fermol<sup>®</sup> Reims Champagne (Pascal Biotech<sup>®</sup>), e dos 24°C e concentrações de nutrientes entre 0,72 e 1,12 g/L, para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ICV<sup>®</sup> D47, poderá acarretar uma maior produção deste composto. No entanto, os resultados apontam que valores superiores a 0,8 g/L são difíceis de obter, não se correndo o risco de ultrapassar o valor máximo admissível.

Em termos de glicerol, os gráficos de contorno obtidos para as duas leveduras foram semelhantes. No entanto, com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ICV<sup>®</sup> D47 obtiveram-se maiores valores de glicerol quando se compararam condições de fermentação idênticas (mesmos valores de temperatura e de concentração de sais). Para ambas as leveduras, à medida que se aumentou a temperatura, a concentração de glicerol foi favorecida. Contudo, deve reduzir-se a gama de concentração de sais a ser utilizada.

Foi na glucose e frutose que se observaram as maiores diferenças entre as leveduras. De forma a evitar refermentações é desejável que os teores de glucose e de frutose no final sejam baixos. Em termos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Fermol<sup>®</sup> Reims Champagne (Pascal Biotech<sup>®</sup>), concentrações elevadas de sal Enovit em conjunto com temperaturas inferiores a 27°C, favorecem o consumo desses açúcares. Pelo contrário, níveis baixos de sal (<0,6) e temperaturas inferiores a 25°C podem originar concentrações finais de glucose e frutose superiores a 3,5 e 10 g/L, respectivamente, o que é indesejável.

No caso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ICV<sup>®</sup> D47 verificou-se que as maiores concentrações finais de glucose (>0,4 g/L) foram obtidas para temperaturas superiores a 24°C e uma concentração de sais de 0,7 e 1,0 g/L. Em relação à frutose, as maiores concentrações foram observadas para temperaturas superiores a 25°C e concentrações de sais superiores a 0,72 g/L ou para temperaturas inferiores a 25°C e concentrações de sais inferiores a aproximadamente 0,76 g/L. Contudo, deve ser

referido que na maior parte das situações, a concentração residual de frutose para esta levedura é mais baixa do que para a Fermol<sup>®</sup> Reims Champagne (Pascal Biotech<sup>®</sup>). No entanto, lembre-se que os modelos desenvolvidos para os dois açúcares não foram tão adequados como para os restantes parâmetros.

Em termos gerais, estes resultados apontam que para ambas as leveduras, as gamas de temperatura e a concentração de sais estudadas não influenciaram muito a produção de etanol, variando entre 10 e 12,5%. Contudo, um aumento da temperatura acima dos 24°C e uma concentração de sais entre 0,70 e 1,15 g/L podem causar uma maior produção de glicerol, bem como de ácido acético. No entanto, em todos os casos a concentração em ácido acético foi inferior a 0,8 g/L, o qual apresenta 1,1 g/L como valor máximo admissível. Uma vez que os modelos desenvolvidos para a levedura Fermol<sup>®</sup> Reims Champagne (Pascal Biotech<sup>®</sup>) foram mais adequados e a sua performance satisfatória, recomenda-se o uso desta levedura na produção futura de hidromel. Além disso, de forma a não se correr o risco de ultrapassar o limite legal do ácido acético, a favorecer a produção de etanol, glicerol, e a obter baixas concentrações de frutose no final da fermentação (<4g/L) para evitar refermentações, recomenda-se operar com essa levedura a uma temperatura entre os 24 e os 29°C e uma concentração de sais entre os 0,85 e 1,0 g/L.

### **Estudo III) Produção de hidromel à escala piloto segundo as melhores condições determinadas no Estudo II) de forma a obter um “hidromel doce” e outro “seco”.**

Tendo em conta que os resultados obtidos para o etanol, ácido acético e glicerol foram da mesma ordem de grandeza para as duas leveduras, que os ajustes dos modelos matemáticos desenvolvidos para a *Saccharomyces cerevisiae* Fermol<sup>®</sup> Reims Champagne (Pascal Biotech<sup>®</sup>), foram mais adequados e que esta levedura, em termos gerais, mostrou um comportamento mais reprodutível e estável, optou-se por utilizá-la no Estudo III, relativo à produção de hidromel à escala piloto. Em termos de condições utilizadas na fermentação optou-se por uma temperatura de 25°C e uma concentração de sais de 90 g/hL. Deve ser referido que em relação à temperatura, a mesma oscilou entre os 25 e os 27°C, uma vez que as cubas utilizadas não apresentavam qualquer manta ou camisa de aquecimento/arrefecimento, situação que simulava a condição mais provável



de encontrar no futuro, aquando da produção de hidromel por parte dos produtores de mel. De referir que estas fermentações decorreram no Verão.

Especificamente, neste estudo pretendeu-se obter produtos com diferentes teores alcoólicos e de doçura, para que os mesmos fossem avaliados por um grupo de consumidores, aos quais se pediu que opinassem sobre o hidromel que gostavam mais em termos organolépticos.

### **III.1 Produção de “hidromel doce”**

Tal como explicado na parte experimental, para se produzir a bebida doce, interrompeu-se a fermentação quando o mosto apresentava 8° Baumé, adicionando aguardente vínica para impedir a utilização dos açúcares pelas leveduras.

O desenvolvimento da fermentação durante a produção de “hidromel doce”, à escala piloto, encontra-se apresentado na Figura 13. Esta fermentação alcoólica foi interrompida às 79 horas, procedendo-se posteriormente à sua aguardentação. Relativamente à biomassa, foi observada uma fase *lag* durante cerca de 10 horas, sugerindo que possivelmente as leveduras, devido à alta concentração de açúcares e à baixa concentração de oxigénio no meio de crescimento, estavam sob condições de *stress*. Após este período, iniciou-se a fase exponencial com uma duração total de cerca de 45 horas.

Em termos de glucose e frutose, também ambos os açúcares foram metabolizados pelas leveduras. A quantidade inicial de açúcares calculada foi de aproximadamente 252 g/L, sendo a glucose metabolizada até concentrações de  $27 \pm 4,2$  g/L e a frutose até concentrações de  $48 \pm 9,6$  g/L. A concentração de etanol determinada foi igual a  $59,5 \pm 0,43$  g/L, a qual subiu para  $149,8 \pm 0,47$  g/L, após aguardentação. O glicerol e o ácido acético também foram produzidos durante a fermentação, atingindo os seguintes valores:  $5,07 \pm 0,54$  e  $0,46 \pm 0,08$  g/L, respectivamente.

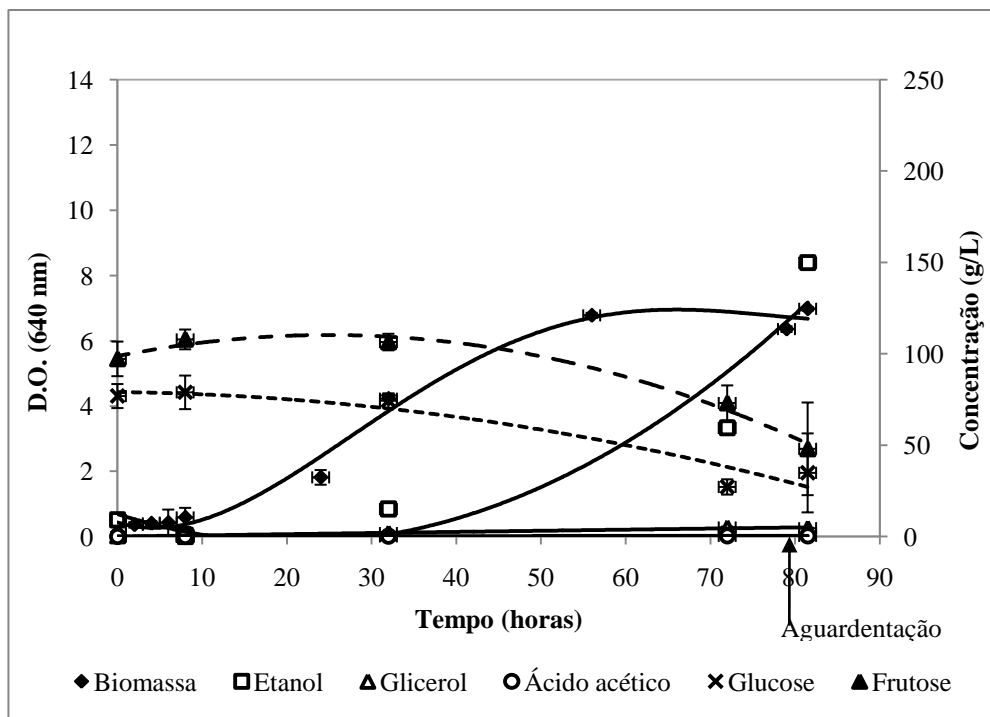


Figura 13 – Desenvolvimento da fermentação na produção de “hidromel doce”.

### III.2. Produção de “hidromel seco”

Tal como referido anteriormente, a produção do “hidromel seco” foi efectuada com os 9 litros sobrantes da fermentação das cubas de inox. Neste caso a fermentação foi completa, pois era importante a metabolização dos açúcares pelas leveduras. Na Figura 14 encontra-se representado o desenvolvimento da fermentação para produzir o “hidromel seco”.

Observou-se igualmente uma fase *lag* de 10 horas, seguida de uma fase exponencial de aproximadamente 40 horas.

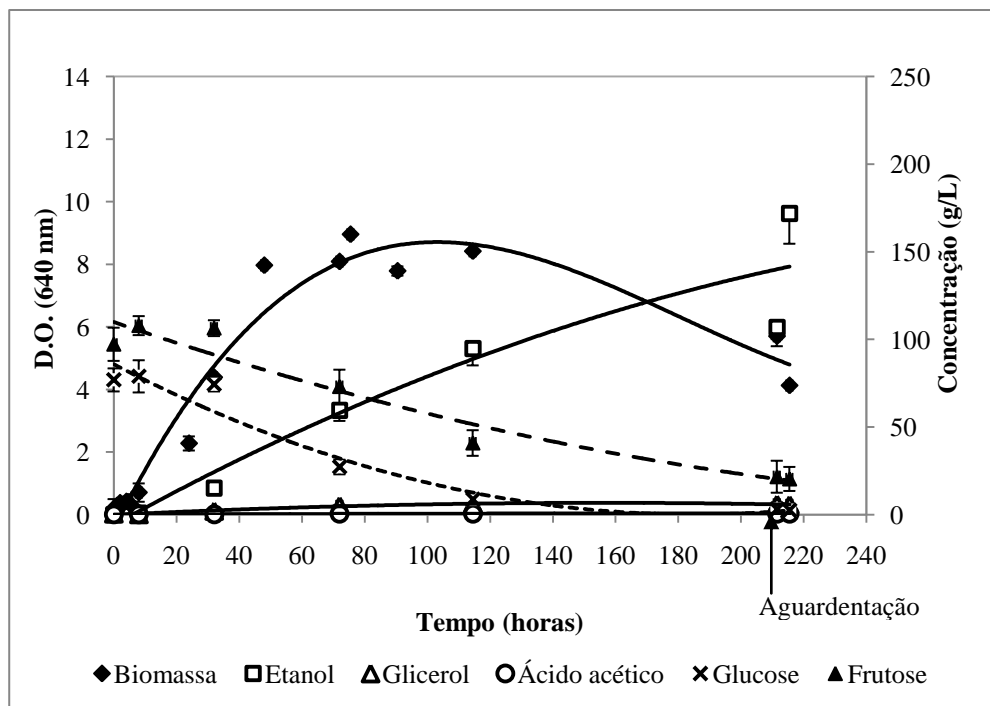


Figura 14 – Desenvolvimento da fermentação na produção de “hidromel seco”.

Verificou-se uma diminuição da biomassa a partir das 90 h, a qual terá sido devida há dificuldade em homogenizar convenientemente o conteúdo da cuba de fermentação, aquando da recolha da amostra. Em termos de glucose e frutose, ambos os açúcares foram metabolizados pelas leveduras, tendo sido a taxa de consumo do primeiro açúcar superior à do segundo.

A concentração final de etanol foi igual a  $106,8 \pm 1,4$  g/L. O glicerol e ácido acético também foram produzidos ao longo da fermentação, atingindo os seguintes valores:  $5,96 \pm 0,95$  e  $0,57 \pm 0,09$  g/L, respectivamente.

A fim de comparar as duas produções, determinaram-se os seguintes parâmetros: produção de etanol aquando da paragem da fermentação em termos de concentração e rendimento, e as concentrações finais de glicerol e ácido acético (Tabela 8).

Tabela 8 – Comparação das produções de “hidromel doce” e “seco” em relação a alguns parâmetros específicos.

Parâmetro	Hidromel doce	Hidromel seco
Tempo total da fermentação (h)	79	211,5
Etanol (g/L)	59,5±0,42	106,8±1,38
Y <sub>Etanol/Açúcares</sub> (%)	23,6	42,4
Glicerol (g/L)	5,07±0,53	5,96±0,95
Ácido acético (g/L)	0,46±0,08	0,57±0,09

\*Determinado como  $\Sigma(\text{Glucose} \pm \text{Frutose})$ .

Os valores apresentados correspondem a médias±desvios-padrão

Como seria de esperar, a quantidade de etanol produzida foi menor às 79 horas (situação relativa à produção de “hidromel doce”), uma vez que houve menor consumo de açúcares. Deve ser novamente referido que, mais uma vez foi visível o comportamento incomum de produção de etanol. Apesar de ser um metabolito primário que se espera ver produzido ao longo da fase exponencial, a sua produção foi também observada ao longo da fase estacionária. Este comportamento foi idêntico ao já referido anteriormente por Pereira *et al.* (2009).

As concentrações de glicerol finais obtidas em ambos os ensaios foram semelhantes e estão de acordo com os valores publicados na literatura para os vinhos por Rankine and Bridson (1971). Em relação ao ácido acético, resultados similares foram obtidos nos dois tipos de produção, continuando os valores a ser menores que o limite legal (inferior a cerca de 1,1 g/L) (Regulamento (CE) N ° 1493/1999, Anexo VB-1b).

### III.3 Provas organolépticas – Análise Estatística

Depois de avaliados os parâmetros sensoriais pelos consumidores, calcularam-se as médias gerais (Tabela 9), as correlações (Tabela 10) e o efeito do teor alcoólico e do teor em açúcar na aceitabilidade das bebidas produzidas em relação ao aroma, doçura, sabor, teor alcoólico e apreciação global (Tabela 11).

Tabela 9 – Médias gerais dos parâmetros sensoriais avaliados nas provas organolépticas do hidromel

	<i>Média ± SD</i>
<b>Teor Alcoólico</b>	4,2±2,21
<b>Apreciação global</b>	4,1±2,76
<b>Aroma</b>	4,5±2,41
<b>Doçura</b>	3,8±2,59
<b>Sabor</b>	3,9±2,70

Na Tabela 10 encontram-se as correlações determinadas entre o álcool, a apreciação global o aroma, a doçura, e o sabor do hidromel. De uma forma geral, os parâmetros sensoriais apresentaram entre si correlações positivas e estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) que variaram entre 0,40 a 0,82. É de salientar as correlações elevadas e positivas observadas entre a apreciação global e o sabor (0,82;  $P < 0,05$ ) e a doçura (0,76;  $P < 0,05$ ), assim como entre o sabor (0,79;  $P < 0,05$ ) e a doçura do hidromel. Estes resultados indicam um efeito elevado do teor em açúcar na aceitação do hidromel pelos consumidores, ao contrário do que foi demonstrado em estudos anteriores por Penha *et al.* (2003), quando analisaram o licor de acerola.

Tabela 10 – Correlações determinadas entre o álcool, apreciação global, aroma, doçura e sabor.

	<i>Álcool</i>	<i>Apreciação global</i>	<i>Aroma</i>	<i>Doçura</i>	<i>Sabor</i>
<b>Álcool</b>	1,00				
<b>Apreciação global</b>	0,69	1,00			
<b>Aroma</b>	0,40	0,44	1,00		
<b>Doçura</b>	0,65	0,76	0,45	1,00	
<b>Sabor</b>	0,62	0,82	0,52	0,79	1,00

Na Tabela 11 apresentam-se os efeitos do teor alcoólico e do teor em açúcar no aroma, doçura, sabor, álcool e apreciação global dos hidroméis analisados pelo painel de consumidores. O teor alcoólico não afectou ( $P > 0,05$ ) os parâmetros sensoriais do hidromel. Pelo contrário, as amostras com maior teor em açúcar apresentaram, em todos os parâmetros sensoriais estudados, maior ( $P < 0,05$ ) classificação pelos consumidores (entre 4,9 e 5,4). Assim, as amostras com maior teor em açúcar foram as que o painel de consumidores mais gostou, apresentando uma apreciação global em torno dos 5,4.

Tendo em conta este valor, o “hidromel doce” surge assim como uma bebida razoável para os consumidores, ao contrário do “hidromel seco”.

Tabela 11 - Efeito do teor alcoólico e do teor em açúcar no aroma, doçura, sabor, álcool e apreciação global do hidromel.

	<i>Aroma</i>	<i>Doçura</i>	<i>Sabor</i>	<i>Álcool</i>	<i>Apreciação global</i>
<b>Teor alcoólico</b>					
18	4,4±2,41a	3,8±2,57a	3,8±2,61a	4,0±2,54a	4,1±2,83a
20	4,3±2,43a	3,9±2,56a	4,0±2,63a	4,2±2,37a	4,1±2,70a
22	4,7±2,39a	3,8±2,70a	3,9±2,84a	4,4±2,61a	4,0±2,77a
<b>Açúcar</b>					
Doce	4,9±2,46a	5,2±2,42b	5,1±2,63b	5,0±2,36b	5,4±2,56b
Seco	4,0±2,27b	2,5±2,02a	2,7±2,18a	3,4±2,39a	2,7±2,23a

A interacção entre o teor alcoólico e o teor em açúcar não foi estatisticamente significativa ( $P>0,05$ ), o que conjugado com a ausência de efeito do teor alcoólico, mostra que os hidroméis com maior teor em açúcar foram os mais apreciados independentemente do teor alcoólico (Figura 15).

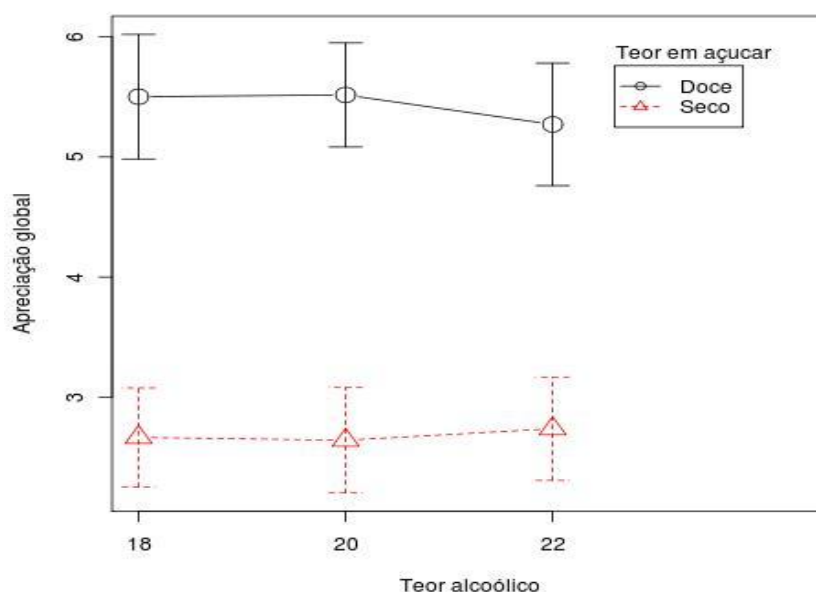


Figura 15 – Representação gráfica da apreciação global dos consumidores, considerando o teor em açúcar e o teor alcoólico do “hidromel”.

## Capítulo IV

### *Conclusões Finais*

## CONCLUSÕES FINAIS

Após a realização de três estudos com vista a avaliar o efeito das condições de produção na qualidade final do hidromel obtido, verificou-se que em termos gerais ao passar da escala laboratorial para a escala piloto, algumas diferenças ao nível do rendimento do etanol em relação aos açúcares consumidos e das concentrações finais de etanol e ácido acético, podem ser observadas.

Ao avaliar o efeito da temperatura e da concentração de nutrientes sobre a produção de hidromel, usando-se duas leveduras comerciais, verificou-se através de um desenho experimental que estes parâmetros não influenciam de forma muito significativa a produção de etanol. Contudo, o aumento da temperatura acima dos 24°C e uma concentração de sais entre 0,70 e 1,15 g/L pode acarretar uma maior produção de ácido acético e de glicerol. No entanto, em nenhum dos casos se obtiveram, para o ácido acético, valores superiores a 0,8 g/L, não se correndo o risco de ultrapassar o valor máximo admissível (1,1 g/L). Relativamente aos açúcares, foi na glucose e frutose que se observaram as maiores diferenças entre as leveduras. No entanto, os modelos desenvolvidos para os dois açúcares não foram tão adequados como para os restantes parâmetros. Contudo, níveis baixos de sal e temperaturas inferiores a 25°C apontam para elevadas concentrações finais de ambos os açúcares, situação indesejável quando se utiliza a levedura Fermol® Reims Champagne. Para o caso da *Saccharomyces cerevisiae* ICV® D47, maiores concentrações finais de glucose podem ser obtidas para temperaturas superiores a 24°C e uma concentração de sais de 0,8 a 1,04 g/L. Em relação à frutose, as maiores concentrações foram observadas a temperaturas superiores a 25°C e concentrações de sais superiores a 0,72 g/L ou temperaturas inferiores a 25°C e concentrações de sais inferiores a 0,76 g/L. Tendo em conta as taxas específicas máximas de crescimento, a levedura ICV® D47 mostrou um comportamento mais irregular e menos reprodutível, explicando em parte, os resultados da menor adequabilidade dos ajustes obtidos para os modelos matemáticos desenvolvidos para esta levedura. Além disso, os modelos matemáticos desenvolvidos para a levedura ICV® D47 também não foram tão adequados como os obtidos para a Fermol® Reims Champagne. Dessa forma, aconselha-se o uso desta última na produção futura de hidromel, e de uma temperatura entre os 24°C e os 29°C e uma concentração de sais entre 85 e 100 g/hL. Com estas condições a produção de etanol e de glicerol, bem como



a obtenção de concentrações baixas de açúcares no final da fermentação, serão favorecidas.

Por fim, produziu-se hidromel à escala piloto, segundo as condições anteriores com diferentes teores de doçura e de álcool. Após análise por um painel de consumidores, verificou-se que o mais apreciado em termos organolépticos foi o doce, independentemente do seu teor alcoólico.

## Capítulo V

### *Referências Bibliográficas*

- Abu-Jdayil, B., Ghzawi, A. A. M., Al-malah, K. I. M., Zaitoun, S., 2002. Heat effect on rheology of light and dark-colored honey. *Journal of Food Engineering*, **51**, 33 – 38.
- Al-Mamary, M., Al-Meer, A., Al-Habori, M., 2002. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*, **22**, 1041-1047.
- Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E., Battino, M., 2010. Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, **3**, 15–23.
- Anklam, E., 1998. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry* **63**, 549–562.
- Arráez-Román, D., Gómez Caravaca, A.M., Gómez-Romero, M., Segura-Carratero, A., Fernadéz-Gutiérrez, A., 2006. Identification of phenolic compounds in rosemary honey using solid-phase extraction by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**, 1648-1656.
- Arroyo-López, F.N., Durán Quintana, M.C., Garrido Fernández, A., 2006. Use of the generalized z-value concept to study the effects of temperature, NaCl concentration and pH on *Pichia anomala*, a yeast related to table olive fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, **106**, 45–51.
- Attfield, P.V., 1997. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nature Biotechnology*, **15**, 1351–1357.
- Azeredo, L.C., Azeredo, M.A.A., Souza, S.R., Dutra, V.M.L., 2003. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. *Food Chemistry*, **80**, 249-254.
- Baltrušaitytė, V., Venskutonis, P.R., Čeksterytė, V., 2007. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chemistry*, **101**, 502-514.
- Bauer, F.F., Pretorius, I.S., 2000. Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine – a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, **21**, 27–51.
- Berthels, N.J., Cordero-Otero, R.R., Bauer, F.F., Thevelein, J.M., Pretorius, I.S., 2004. Discrepancy in glucose and fructose utilization during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Research*, **4**, 683–689.
- Bisson, L.F., 1999. Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, **50**, 107–119.
- Box, G.E.P. and Wilson, K.B., 1951. Experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society* **13**, 1–45
- Cacace, J.E., Mazza, G., 2003b. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, **59**, 379–389.

Carrasco, P., Querol, A., del Olmo, M., 2001. Analysis of the *stress* resistance of commercial wine yeast strains. *Archives of Microbiology*, **175**, 450-457.

Casellas, G.B., 2005. Effect of low temperature fermentation and nitrogen content on wine yeast metabolism. Tese de Doutoramento. Universitat Rovira i Virgili.

Castro, I.A., Tirapegui, J., Silva R.S.S.F., 2000. Protein mixtures and their nutritional properties optimized by response surface methodology. *Nutrition Research*, **20**, 1341–53.

Cherbuliez, T., Domerego, R., 2003. L'apithérapie, médecine des abeilles. Edition Amyris, p. 255

Chung, S.H., Ma, D.L., Braatz, R.D., 2000. Optimal model-based experimental design in batch crystallization, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **50**, 83–90.

Codex Alimentarius., 2001. Revised codex standard for honey. United Nations. Rome. Codex Stan 12 – 1981.

Costa, A., Atala, D., Maugari, F., Maciel, R., 2001. Factorial design and simulation for the optimization and determination of control structures for an extractive alcoholic fermentation. *Process Biochemistry*, **37**, 125–137

Cuevas-Glory, L., Pino, J., Santiago, L., Sauri-Duch, E., 2007. A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Journal Food Chemistry*, **103**, 1032-1043

D'Amato, D., Corbo, M.R., Del Nobile, M.A., Sinigaglia, M., 2006. Effects of temperature, ammonium and glucose concentrations on yeast growth in a model wine system. *International Journal of Food Science & Technology*, **41**, 1152–1157.

de Rodríguez, G.O., Ferrer, B.S., Ferrer, A., Rodríguez, B., 2004. Characterization of honey produced in Venezuela. *Food Chemistry*, **84**, 499-502.

Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro, Diário da República Iª Serie A.

Dennis, C., Webster, J., 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interaction. *Transactions of British Mycological Society*, **57**, 363-369

Directiva CE nº 2001/110 de 20 de Dezembro de 2001.

Elad, Y., Chet, I., Heins, Y., 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, **28**, 719-725

FAO., 1996. Value-added products from beekeeping. FOA Agricultural Services Bulletin. Rome, Italy: FAO.

Finola, M.S., Lasagno, M.C., Marioli, J.M., 2007. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chemistry*, **100**, 1649-1653.

- Fleet, G.H., 1998. The microbiology of alcoholic beverages. In *Microbiology of Fermented Foods*, (eds) B.J. Wood. Chapman & Hall, Glasgow, 217–262.
- Gheldof, N., Wang, X.H., Engeseth, N. J. J., 2002. Identification and Quantification of Antioxidant Components of Honeys from Various Floral Sources. *Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 5870–5877.
- Ginevra, L.B., Beatriz, M.D., Altero, A., Francisco, R. L., 2002. Optimization of heme iron analysis in raw and cooked red meat. *Food Chemistry*, **78** (4), 505–510.
- Hohmann, S., Mager, W.H., 2003. Yeast Stress Responses. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Ivorra, C., Pérez-Ortín, J.E., del Olmo, M., 1999. An inverse correlation between *stress* resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A Molecular Study. *Journal of Food Technology*, Campinas, **6**, 33-42.
- Karasau, Y.S., Özbas, Y., 2003. Production of glycerol by biochemical routes and its importance in wine fermentations. *Gida*, **28**, 339–347.
- Kennedy, M., Reader. S. L., Davies, R. J., 1994. The kinetics of developing fermentation media. *Process Biochemistry*, **29**, 529-534.
- Küçük, M., Kolailı, S., Karaoğlu, S., Ulusoy, E., Baltacı, C., Candan, F., 2007. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, **100**, 526-534.
- Levigne, S., Ralet, M.C., Thibault, J.F., 2002. Characterization of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. *Carbohydrate Polymers*, **49**, 145–153.
- Li, Q.H., Fu, C.L., 2005. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. *Food Chemistry*, **92** (4), 701–706.
- Mao, X.B., Eksriwong, T., Chauvatcharin, S., Zhong, J.J., 2005. Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Process Biochemistry*. **40**, 1667–1672.
- Navrátil, M., Sturdík, E., Gemeiner, P., 2001. Batch and continuous mead production with pectate immobilised, ethanol-tolerant yeast. *Biotechnology Letters*, **23**, 977–982.
- Noble, A.C., Bursick, G.F., 1984. The contribution of glycerol to perceived viscosity and sweetness in white wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. **35**, 110-113.
- O'Connor-Cox, E.S., Ingledew, W.M., 1991. Alleviation of the effects of nitrogen limitation in high gravity worts through increased inoculation rates. *Journal of Industrial Microbiology*, **7**, 89–96.

- Ozer, E.A., Herken, E.N., Guzel, S., Ainsworth, P., Ibanoglu, S., 2006. Effect of extrusion process on the antioxidant activity and total phenolics in a nutritious snack food. *International Journal of Food Science & Technology*, **41**, 289–93.
- Parajo, J.C., Santos, V., Dominguez, H., Vazquez, M., 1995. NH<sub>4</sub>OH-based pretreatment for improving the nutritional quality of single-cell protein (SCP). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **55**, 133–150.
- Pato, O., 1982. O vinho: sua preparação e conservação. Clássica Editora, Lisboa, 183-188.
- Penha, E.M., Della, M.R.C., Gonçalves, E.B., Silva, A. L. S., Moretti, R.H., 2003. Efeito dos Teores de Álcool e Açúcar no Perfil Sensorial de Licor de Acerola. *Brazilian Journal of Food Techonology*, **6**, 33-42.
- Pereira, A.P., Dias, T., Andrade, J., Ramalhosa, E., Estevinho, L.M., 2009. Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 2057-2063.
- Rankine, B.C., Bridson, D.A., 1971. Glycerol in Australian wines and factors influencing its formation. *American Journal of Enology and Viticulture*, **22**, 6–12.
- Regulamento (CE) N ° 1493/1999, Anexo VB-1b.
- Ridout, C.J., Coley-Smith, J.R., Lynch, J.M., 1986. Enzyme activity and electrophoretic profile of extracellular protein induced in *Trichoderma* spp. by cell walls of *Rhizoctonia solani*. *Journal of General Microbiology*, **132**, 2345-2352.
- Senanayake, S. P. J. N., & Shahidi, F., 2002. Lipase-catalyzed incorporation of docosahexaenoic acid (DMA) into borage oil: optimization using response surface methodology. *Food Chemistry*, **77**, 115–123.
- Senanayake, S.P.J.N., Shahidi, F., 1999. Enzyme-assisted acidolysis of borage (*Borage officinalis* L.) and evening primrose (*Oenothera biennis* L.) oils: Incorporation of  $\alpha$ -3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 3105–3112.
- Smith, F.G., 1967. Deterioration of the colour of honey. *Journal Apicultural of Research*, **6**, 95 – 98.
- Tanyildizi, M. S., Ozer, D., Elibol, M., 2005. Optimization of  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. *Process Biochemistry*, **40** (7), 2291–2296.
- Telez-Luis, S.J., Moldes, A. B., Alonso, J.L., Vazquez, M., 2003. Optimization of lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* through response surface methodology. *Journal of Food Science*, **68**, 1454–1458.

- Vasquez, M., Martin, A., 1998. Optimization of *Phaffia rhodozyma* continuous culture through response surface methodology. *Biotechnology and Bioengineering*, **57**, 314-320.
- Vohra, A., Satyanarayana, T., 2002. Statistical optimization of the medium components by response surface methodology to enhance phytase production by *Pichia anomala*. *Process Biochemistry*, **37**(9), 999–1004.
- Wang, Y.X., Lu, Z.X., 2005. Optimization of processing parameters for the mycelial growth and extracellular polysaccharide production by *Boletus* spp. ACCC50328. *Process Biochemistry* **40**, 1043–1051.
- White, J.W., 1975. Composition of honey. In: Crane, E. (Ed.), Honey, A Comprehensive Survey, vol. 5. Heinemann, London, UK, 157–206.
- Wu, Y.W., 2002. Testing design and data processing. Suzhou, China: Suzhou University Press, 187-193.
- Yu, J., Zhang, X., Tan, T., 2009. Optimization of media condition for the production of ethanol from sweet sorghum juice by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and bioenergy*, **33**, 521-526.
- Zabriskie, D.W., Armiger, W.B., Phillips, D.H., Albano, P.A., 1982. Trader's guide to fermentation media formulation. *Traders Protein*, Memphis, Tennessee, USA.
- Zhang, J., Greasham, R., 1999. Chemically defined media for commercial fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **51**, 407-421.
- Zuzuarregui, A., del Olmo, M., 2004. Expression of stress response genes in wine strains with different fermentative behaviour. *FEMS Yeast Research*, **4**, 699–710.

## Capítulo IV

*Anexos*



Provedor	Copo A	Copo B	Copo C	Copo D	Copo E	Copo F
	Doce			Seco		
1	4	5	6	1	2	3
2	4	5	6	1	2	3
3	4	5	6	1	2	3
4	4	6	5	1	2	3
5	4	6	5	1	2	3
6	4	6	5	1	2	3
7	5	6	4	2	3	1
8	5	6	4	2	3	1
9	5	6	4	2	3	1
10	5	4	6	2	1	3
11	5	4	6	2	1	3
12	5	4	6	2	1	3
13	6	5	4	3	2	1
14	6	5	4	3	2	1
15	6	5	4	3	2	1
16	6	4	5	3	1	2
17	6	4	5	3	1	2
18	6	4	5	3	1	2
Provedor	Copo A	Copo B	Copo C	Copo D	Copo E	Copo F
	Seco			Doce		
19	1	2	3	4	5	6
20	1	2	3	4	5	6
21	1	2	3	4	5	6
22	1	3	2	4	5	6
23	1	3	2	4	5	6
24	1	3	2	4	5	6
25	2	3	1	5	6	4
26	2	3	1	5	6	4
27	2	3	1	5	6	4
28	2	1	3	5	4	6
29	2	1	3	5	4	6
30	2	1	3	5	4	6
31	3	2	1	6	5	4
32	3	2	1	6	5	4
33	3	2	1	6	5	4
34	3	1	2	6	4	5
35	3	1	2	6	4	5
36	3	1	2	6	4	5

1= Seco a 18°; 2= Seco a 20°; 3= Seco a 22°; 4=Doce a 18°; 5=Doce a 20°; 6=Doce a 22° de álcool.

Anexo 1 – Distribuição das seis amostras de hidromel pelos provedores.

Nome _____		Código: _____	
Sexo: Feminino <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/>		Idade: ____	
		<i>Não gosto nada</i> <span style="float: right;"><i>Gosto muito</i></span>	
<i>Aroma</i>	<div style="border: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div>		
<i>Sabor</i>	<div style="border: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div>		
<i>Doçura</i>	<div style="border: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div>		
<i>Teor alcoólico</i>	<div style="border: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div>		
<i>Apreciação global</i>	<div style="border: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div>		
<b>Observações</b>			

Anexo 2 – Ficha de prova